

Ana Carolina Lopes Simões Teixeira



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

- *Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução."*

Ana Carolina Lopes Simões Teixeira

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

□ *Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução."*

Ana Carolina Lopes Simões Teixeira

- *Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução."*

Assinatura do autor atestando originalidade do trabalho:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa,
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Ciclo Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma exponencial a sua solubilidade aquosa. A capacidade de encapsular fármacos proporciona importantes incrementos na biodisponibilidade e estabilidade de inúmeras formas farmacêuticas atualmente comercializadas, ao mesmo tempo que novas possibilidades de utilização estão sendo pesquisadas.

Para demonstrar a capacidade de encapsulação, bem como para avaliar a extensão de formação do complexo, são necessários métodos de análise específica, tais como: método de solubilidade, método enzimático, fluorescência, espectrometria de ressonância magnética nuclear, entre outros.

Neste trabalho é feita uma revisão bibliográfica sobre a história e usos das CDs, bem como a sua aplicação em complexos de inclusão com diversos fármacos, recorrendo a exemplos de estudos realizados por diversos autores.

Palavras-chave: Ciclodextrinas, Complexos de inclusão; Fármaco.

Abstract

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides highly water soluble able to form reversible inclusion complex with apolar molecules and increase enormously their aqueous solubility. The CDs capability of encapsulating drugs improves the bioavailability and stability of several dosage forms on the market. At the same time, new uses have been investigated.

To demonstrate the ability of encapsulation and to measure the extent of complex formation, methods are needed for specific analysis, such as solubility method, enzymatic, fluorescent, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and others.

This work is a literature review on the history and uses of CDs, as well as its application in inclusion complexes with various drugs, using examples of studies by various authors.

Keywords: Cyclodextrins, Inclusion complexes; Drug.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Um especial Obrigada,

À Professora Dr.^a Rita Oliveira pela sua capacidade pedagógica, pela compreensão, dedicação, partilha dos seus conhecimentos e apoio nesta decisiva etapa da minha vida.

Aos meus pais, importantes e fundamentais alicerces da minha existência, pois foram eles que me transmitiram a beleza e a essência do que é servir o próximo.

À minha mãe, Manuela Teixeira, meu orgulho, meu exemplo de vida, minha inspiração.

Ao meu pai, António Teixeira pela maneira como sempre me ensinou a olhar o futuro e a lutar por ele.

À minha irmã, Daniela Teixeira por me ter ensinado que a beleza das coisas reside no simples facto de elas existirem.

Aos melhores avós do mundo, Adélia Fernandes e João Lopes pela cumplicidade, incentivo, apoio e amizade de sempre.

Ao Beto, pelo seu companheirismo, carinho, amizade e amor em todos os momentos.

Ao meu Avô, Joaquim Teixeira onde quer que esteja, esta monografia e a minha futura vida profissional são dedicadas a ele. Espero estar à altura!

Ao meu grande amigo, Alexandre Almeida pelo incalculável apoio em todos os bons e menos bons momentos, por toda a amizade e partilha, mas principalmente por ser quem é e por ter de todas as formas ter contribuído para a pessoa que hoje sou.

À Ritinha, por tudo o que partilhámos, por todos os sorrisos, lágrimas, gargalhadas, e essencialmente por me ter ensinado o verdadeiro significado da amizade.

À Mariana Santos e à Sílvia Dias minhas grandes e verdadeiras amigas, por tudo o que são e representam, por tudo o que sou quando estou com elas e por terem de todas as maneiras possíveis contribuído para a realização desta monografia.

A todos os outros Amigos, que estiveram, estão e estarão para sempre presentes, o meu mais sincero obrigada. Sem vocês, o que seria de mim?

Índice

Capítulo I. Introdução	1
I.1 Breve história das Ciclodextrinas	1
I.2 Estrutura das Ciclodextrinas	3
I.3 Formação de Complexos de Inclusão	10
I.3.1. Molécula hóspede e CD: Propriedades físico-químicas	12
I.3.1.1. Complexação	14
I.3.1.2. Estequiometria e dose terapêutica	16
I.3.1.3. Toxicidade	17
I.3.1.4. Dissociação dos complexos	18
I.4 Vantagens e aplicações da utilização de Ciclodextrinas	21
I.5 Vantagens da aplicação dos complexos de ciclodextrinas em sistemas de veiculação de fármacos	29
Capítulo II. Formação de complexos em solução	34
Conclusão	43
Referências Bibliográficas	45

Índice de Figuras

Figura I: Estrutura da β -CD com posição dos grupos hidroxilos e da cavidade apolar assinalada.....6

Figura II: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão, sendo o ácido salicílico a molécula hóspede.....11

Figura III: Esquema dos equilíbrios de ligação às proteínas plasmáticas e substituição competitiva no processo de formação e dissociação de complexos F-CD.....18

Figura IV: Diagrama tipo A e B- Relações de solubilidade de fases.....35

Figura V: Diagrama de fases obtido a partir da complexação de um fármaco com uma CD.....36

Figura VI: Diagrama de solubilidade de fases com 100Mm de revesterol e solução tampão de borato de sódio (pH 9) com HP- β -CD (□) e G₂- β -CD (•). Detalhe também para o diagrama de fases do revesterol e β -CD (■).....39

Figura VII: Gráficos (A e B): Espectros RMN- ¹H. **a)** Espectro da sulfodiazida; **b)** Espectro do complexo sulfodiazida e M β CD; **c)** Espectro de M β CD.....41

Figura VIII: Modelação molecular do complexo piroxicam-
CD.....42

Índice de Tabelas

Tabela I: Estrutura e propriedades físico-químicas da α CD, β CD e γ CD.....5

Tabela II: Solubilidades (g/100ml) das CDs naturais em água a diferentes temperaturas.....7

Tabela III: Solubilidades (g/100ml) das CDs naturais em solventes orgânicos.....8

Tabela IV: Constante de Estabilidade dos complexos candesartan / CDs em tampão fosfato 0,1 M a pH 8,0 e 25 ° C.....16

Tabela V: Medicamentos disponíveis no mercado mundial contendo CDs.....24

Tabela VI: Constantes de complexação (K_C) dos complexos formados entre as CDs naturais e modificadas e o revesterol, calculada através do método enzimático, de solubilidade e fluorimétrico.....38

Lista de Abreviaturas

CDs: Ciclodextrinas

α -CD: alfa-ciclodextrina

β -CD: beta-ciclodextrina

γ -CD: gama-ciclodextrina

DM- β -CD: 2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina

SBE- β -CD: Sulfobutil-éter- β -ciclodextrina

RM- β -CD: Randomil- β -ciclodextrina

HP- β -CD: Hidroxipropil- β -ciclodextrina

M- β -CD: Metil- β -ciclodextrina

G2-p-CD: maltosil- β -CD

K_C : Constante de Estabilidade

K_D : Constante de dissociação

F-CD: Complexo Fármaco-Ciclodextrina

CGTase: Ciclodextrina-glicosil-transferase

7-DHC: 7-dihidrocloesterol

RMN: Espectrometria de ressonância magnética nuclear

UV/Vis: Ultravioleta/Visível

□ Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução □

Capítulo I- Introdução

I.1- Breve História das Ciclodextrinas

A primeira descrição relacionada com os compostos presentemente conhecidos por ciclodextrinas (CDs) data de 1891, tendo sido atribuída a Villier (Szejtli, 1998). Segundo outros autores, este terá provavelmente isolado uma pequena quantidade de um composto cristalino, a partir de um meio de cultura de *Bacillus amylobacter*, contendo amido, o qual denominou de “cellellosine”, devido às fortes semelhanças desta substância com a celulose (Szejtli, 1998). Já em 1903, Schardinger foi capaz de isolar produtos cristalinos, nomeadamente dextrina A e dextrina B, que apresentavam falta de poder de redução. Contudo, a linhagem bacteriana capaz de produzir estes compostos a partir do amido não foi mantida. Em 1904, Schardinger isolou um novo organismo capaz de produzir acetona e álcool etílico a partir de açúcar e amido contendo material vegetal. Em 1911, ele descreveu que esta cultura de bactérias, chamada *Bacillus macerans*, também era capaz de produzir grandes quantidades de amido cristalino de dextrina (25-30%) (Eastburn e Tao, 1994). Schardinger denominou os seus produtos cristalinos de α -dextrina cristalizada e β -dextrina cristalizada. Em 1935, a λ -dextrina foi também isolada, e vários esquemas de fracionamento para a produção de ciclodextrinas foram desenvolvidos. Naquele tempo, as estruturas destes compostos ainda não tinham sido bem estudadas, mas em 1942, as estruturas da α e β ciclodextrinas, foram determinadas por cristalografia de raios X (Buschmann e Schollmeyer, 2002). Em 1948, e em seguimento do estudo das ciclodextrinas através da aplicação da técnica com raios X, desenvolveu-se a análise da λ -ciclodextrina e reconheceu-se a capacidade das ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão. Contudo, a primeira patente registada com CDs e seus complexos de inclusão data de 1953, e até 1970, as CDs apenas eram produzidas, em quantidades muito pequenas, com um reduzido grau de pureza e os seus custos elevados de produção inibiam a sua aplicação generalizada ao nível industrial (Szejtli, 1998).

Somente em 1961, se reconheceram mais ciclodextrinas contendo algumas destas mais monómeros, como a η -ciclodextrina (9 a 12 monómeros) (Hirose e Yamamoto, 2001).

Com o contributo dos avanços tecnológicos das últimas décadas conseguiu-se obter ciclodextrinas naturais e seus derivados com um elevado grau de pureza, em larga escala e com preços competitivos, fomentando assim uma forte expansão da utilização das ciclodextrinas no sector farmacêutico (Bhardwaj, Dorr e Blanchard, 2000).

No que concerne à indústria farmacêutica, esta tem utilizado as ciclodextrinas devido às suas propriedades complexantes, que resultam num aumento da solubilidade e dissolução de fármacos insolúveis, bem como da sua biodisponibilidade e estabilidade. Por outro lado, a irritação gástrica ou ocular poderá também ser reduzida, assim como odores ou sabores desagradáveis causados por determinados fármacos. Além disso, as ciclodextrinas (CDs) apresentam propriedades, que permitem prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes e ainda contribuem para a conversão de fármacos líquidos em pós amorfos microcristalinos (Buschmann e Schollmeyer, 2002; Lu e Chen, 2002; Buadin *et al.*, 2000).

A partir da degradação enzimática do amido (polímero linear constituído por unidades de glucose), obtêm-se as ciclodextrinas, por intermédio da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase). Em 1939, Freudenberg e colaboradores, propuseram o mecanismo de formação das CDs, tendo por base a estrutura helicoidal do amido (Szetjli, 1998).

Para o processo de produção das CDs, consideram-se mais relevantes as seguintes fases:

- Cultura de microrganismos que produzem a enzima CGTase.
- Separação da enzima do meio, sua concentração e purificação.
- Conversão enzimática do amido pré-hidrolisado (mistura de dextrinas acíclicas) numa mistura de dextrinas cíclicas e acíclicas.
- Separação das CDs da mistura anterior, sua purificação e cristalização.

As enzimas CGTase, podem ser produzidas por diferentes microrganismos como o *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Klebsiella pneumoniae* entre outros (Szejtli, 1998). Estas enzimas originam misturas de dextrinas e ciclização de fragmentos oligossacarídicos, pela hidrólise de determinadas ligações glicosídicas do amido (Bekers *et al.*, 1991).

As enzimas CGTase desenvolvidas pelo *Bacillus macerans*, bem como pela *Klebsiella pneumoniae* produzem preferencialmente α CD, enquanto que as enzimas desenvolvidas pelo *Bacillus alcalofílico* produzem principalmente β CD. Contudo, é de notar que a imobilização da enzima CGTase num suporte inerte e insolúvel permite o uso contínuo da enzima e possibilita o desenvolvimento de um processo de produção de CDs mais eficiente (Matioli, Zanin e Moraes, 2002). A adição de solventes orgânicos apropriados que permitam a precipitação de apenas uma determinada CD, contribui para a separação das CDs da mistura de conversão (Armbruster, 1988; Szejtli, 1991).

Inicialmente, as CDs eram produzidas com um baixo grau de pureza, em quantidades muito reduzidas e acarretavam elevados custos de produção, o que contribuía para a inibição e aplicação limitada destas moléculas a nível industrial. Porém, com o decorrer do tempo e desenvolvimento de novos e apurados avanços tecnológicos, tem-se assistido à descoberta da sequência e clonagem da maioria dos genes das enzimas CGTase, o que contribui para uma produção em larga escala das CDs, com um custo reduzido e conseqüentemente uma maior expansão e aplicações destas moléculas a nível farmacêutico (Loftsson e Masson, 2001).

1.2- Estrutura das CDs

As CDs apresentam-se como sendo oligossacarídeos cíclicos, constituídos por unidades D-glucopiranosídicas (glucose), ligadas entre si por meio de ligações α - 1,4 glicosídicas (Giordano, Novak e Moyano, 2001). As CDs obtidas com maior rendimento contêm 6, 7, 8 unidades de glucose e são respetivamente conhecidas e denominadas por α CD, β CD e γ CD. Todas estas moléculas apresentam-se cristalinas, não-higroscópicas e de

produção industrial. CDs, que contêm um número inferior a 6 unidades de glucose, não existem por razões estereoquímicas (Dass e Jessup, 2000).

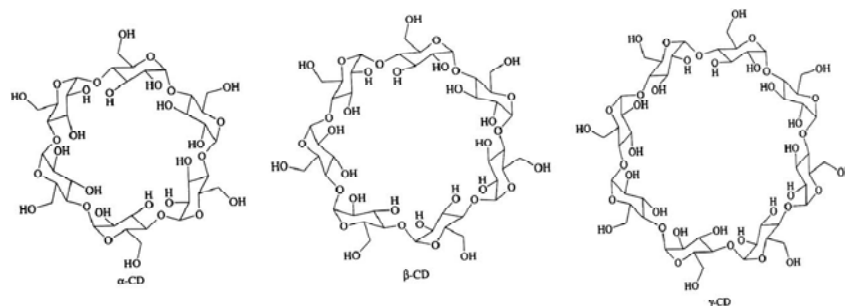
Por outro lado, já foram também identificadas CDs com mais de 8 unidades de glucose, mas estas são produzidas com um rendimento muito baixo e as suas propriedades complexantes são fracas, pelo que têm reduzido interesse farmacêutico (Loftsson e Brewster, 1997).

Algumas das mais importantes propriedades físico-químicas das CDs naturais, α -CD, β -CD e γ -CD, encontram-se representadas e sumariadas na tabela I.

As CDs apresentam uma forma tronco-iónica devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e da conformação em cadeira apresentadas pelas unidades de glucose. Nesta estrutura, os grupos hidroxilo secundários encontram-se localizados nos átomos C-2 e C-3 das unidades de glucose e na extremidade mais larga, enquanto os grupos hidroxilo primários ligados aos átomos C-6 das unidades de glucose se localizam na extremidade oposta mais estreita (Loftsson e Brewster, 1996).

□ Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução □

Tabela I: Estrutura e propriedades físico-químicas da α -CD, β -CD e γ -CD, (adaptado de Del Valle, 2004).



	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucose (n°)	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100ml a 25 °C)	14,5	1,85	23,2
[α]_D (25 °C)	150 ± 0,5	162,5 ± 0,5	177,4 ± 0,5
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5- 8,3
Altura da estrutura tronco-cônica (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Volume aproximado da cavidade (Å³)	174	262	427
Forma dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramas monocíclicos	Prismas quadráticos
pKa (a 25 °C)	12,333	12,202	12,081
Ciclodextrinas (CDs)	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina

A livre rotação dos grupos hidroxilo primários que reduz o diâmetro efetivo da cavidade na extremidade mais estreita da molécula, contrariamente aos grupos hidroxilos secundários que não possuem esse movimento de rotação, proporciona a disposição molecular (Krzysztof e Katarzyna, 2008). Seguidamente na figura I pode visualizar-se uma representação da estrutura química e da forma tronco-cónica da β -CD, (CD natural com maior aplicação farmacêutica).

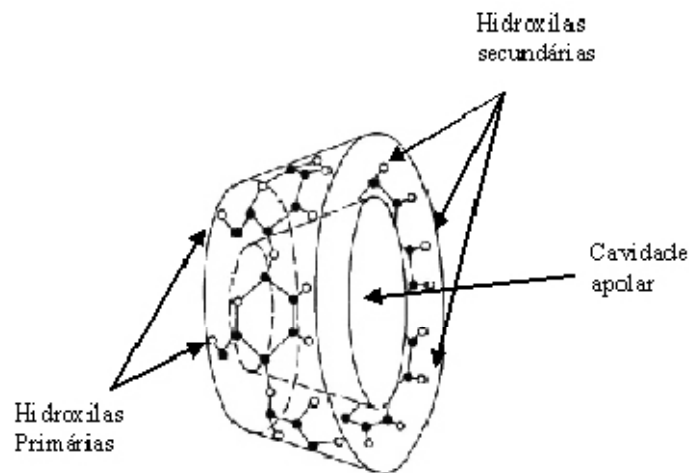


Figura I: Estrutura da β -CD com posição dos grupos hidroxilos e da cavidade apolar assinalada, (adaptado de Sá Barreto e Cunha-Filho, 2008).

A superfície externa das CDs caracteriza-se por ser hidrofílica, uma vez que os grupos –CH ligados aos prótons H-1, H-2 e H-4 se encontram no exterior da molécula e os grupos hidroxilo orientam-se para o exterior do cone. Por outro lado, o revestimento da cavidade interna da CD é delineado por dois anéis de grupos –CH, aos quais estão ligados os prótons H-3 e H-5, e por pontes glicosídicas (O-4) de éteres de oxigênio (Astray *et al.*, 2009).

Os pares de elétrons livres dos átomos de oxigénio envolvidos nas pontes glicosídicas estão dirigidos para o interior da cavidade, produzindo assim localmente um ambiente de elevada densidade eletrónica, que por sua vez confere à superfície interna da molécula de CD um carácter extremamente hidrofóbico. A estabilização do anel macrocíclico é devida às ligações de hidrogénio intramoleculares estabelecidas entre os grupos C₂-OH de uma unidade de glucose, com os grupos C₃-OH de uma unidade de glucose adjacente, contribuindo assim para uma estrutura rígida, que por sua vez, é a causa da reduzida solubilidade aquosa da β-CD (Astray, 2009). Em virtude de uma unidade de glucose se encontrar em posição distorcida, apenas quatro das seis possíveis ligações de hidrogénio podem ser estabelecidas na molécula de α-CD. Das três CDs naturais, a γ-CD, por ser uma molécula não-coplanar, de estrutura mais flexível, é das três a que apresenta maior solubilidade e maior rendimento (Del Valle, 2004). Nas tabelas abaixo representadas, estão indicadas as solubilidades das referidas CDs naturais em água e em diversos solventes.

Tabela II: Solubilidades (g/100ml) das CDs naturais em água a diferentes temperaturas, (adaptado de Chen *et al.*, 2004).

Temperatura	α-CD	β-CD	γ-CD
20	9	1,64	18,5
25	12,7	1,85	25,6
30	16,5	2,28	32,0
35	20,4	2,83	39,0
40	24,2	3,49	46,0
45	28,5	4,40	58,5
50	34,7	5,27	-
60	-	7,49	-
70	-	12,03	-
80	-	19,66	-

Tabela III: Solubilidades (g/100ml) das CDs naturais em solventes orgânicos, (adaptado de Szejtli, 1998).

Solvente orgânico	α -CD	β -CD	γ -CD
Éter dietílico	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Clorofórmio	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Isopropanol	Insolúvel	Insolúvel	□ 0,1
Acetona	Insolúvel	Insolúvel	□ 0,1
Etanol	Insolúvel	Insolúvel	□ 0,1
Metanol	Insolúvel	Insolúvel	□ 0,1
Glicerina	Insolúvel	4,3	-
Propilenoglicol	1	2	-
Dimetilsulfóxido	2	35	-
Piridina	7	37	-
Etilnoglicol	9	21	-
Dimetilformamida	54	32	-

É de especial importância referir que as CDs comportam-se de maneiras diferentes em diferentes meios, ou seja, em meio alcalino as CDs são bastante estáveis, mas hidrolisam-se em meio fortemente ácido (Zia, Rajewski e Stella 2001). São completamente resistentes à degradação enzimática pela β -amilase, mas são suscetíveis de ser atacadas pela α -amilase. Esta α -amilase, ao contrário da β -amilase, não necessita de grupos terminais para a sua ação, embora a velocidade de hidrólise seja mais baixa (Duan *et al.*, 2005). Vários hidratos estáveis podem ser formados pelas CDs. A estabilidade das CDs é parecida à da sacarose ou amido, podendo ser armazenadas, sem deterioração durante anos (Redenti, Szent e Szejtli, 2000; Redenti *et al.*, 2001).

Ao longo do último século, assistiu-se a um “scale-up” exponencial da utilização das CDs nas mais diversas áreas industriais. Tal facto, deve-se em grande parte a: estas moléculas se apresentarem como produtos semi-naturais, produzidos a partir de fontes naturais renováveis (amido) por intermédio de uma conversão enzimática relativamente simples; apresentarem custos aceitáveis para a maioria das aplicações industriais; pela sua capacidade de formar complexos de inclusão, que modificam consideravelmente as

propriedades das moléculas complexadas que posteriormente têm uma vasta aplicação industrial; devido aos mínimos efeitos secundários e por último, devido a estas moléculas poderem ser consumidas pelo homem numa variedade de produtos tais como medicamentos, alimentos e cosméticos (Singh, Sharma e Banerjee, 2002).

É de enfatizar que a β -CD, apesar da sua limitada solubilidade, é a CD natural com maior aplicação no sector farmacêutico, uma vez que é obtida na indústria com um elevado rendimento e qualidade, apresenta baixos custos, é detentora de uma cavidade interna cujas dimensões são excepcionais para incorporar compostos aromáticos hidrófobos, e pela sua utilização em preparações farmacêuticas se encontrar facilitada devido à aprovação regulamentar do seu estatuto como excipiente (Loftsson, Masson e Sigurjondottir, 1999; Del Valle, 2004).

Muito embora as CDs naturais (α -CD, β -CD e γ -CD) sejam muito utilizadas no desenvolvimento e investigação de formulações farmacêuticas, elas apresentam algumas propriedades menos adequadas enquanto veículos de fármacos. É de realçar a β -CD, pois apresenta uma solubilidade aquosa bastante reduzida (1,85 % m/v, a 25⁰C), devido à estrutura rígida resultante da formação de pontes de hidrogénio intramoleculares entre os seus grupos hidroxilos secundários. Posto isto, houve necessidade de se desenvolver CDs quimicamente modificadas, cuja maior solubilidade e menor toxicidade sejam as ideais quando administradas por via parenteral (Bhardwaj, Dorr e Blanchard, 2000). A introdução, a nível dos grupos hidroxilo que formam as ligações de hidrogénio intramoleculares, de diferentes substituintes resulta num aumento drástico da solubilidade aquosa da β -CD (Schneiderman e Stalcup, 2000).

A oferta da possibilidade de um aumento na capacidade de inclusão dos seus derivados, bem como a melhoria da solubilidade e toxicidade, torna vital a ocorrência de modificações químicas na estrutura das moléculas das CDs. As CDs modificadas podem assim sofrer efeitos de derivatização, originando diversos e diferentes derivados (hidrófilos, hidrófobos e ionizáveis) (Loftsson, Matthíasson e Masson, 2003; Zia, Rajewski e Stella, 2001).

I.3 - Formação de Complexos de Inclusão

A característica mais notável das CDs é a sua capacidade para formar complexos de inclusão sólidos, com uma gama muito ampla de sólidos, líquidos e gases, através de um fenómeno de complexação molecular (Brewster e Loftsson 2007). Nestes complexos, a molécula hóspede é incorporada dentro da molécula hospedeira, a CD. A formação do complexo de inclusão é um ajuste dimensional entre a cavidade da molécula hospedeira (CD) e a molécula hóspede (Dorrego *et al.*, 2001). A cavidade lipofílica das moléculas de CD fornece um microambiente em que moléculas hóspedes não-polares com tamanhos apropriados podem entrar para formar complexos de inclusão (Garcia-Rio *et al.*, 2005). É de notar que nenhuma ligação covalente é quebrada ou formada durante a formação do complexo de inclusão (Schneiderman e Stalcup, 2000). Assim sendo, os complexos de inclusão são entidades compostas por duas ou mais moléculas, nas quais uma das moléculas, hospedeira, inclui total ou parcialmente, sem estabelecimento de ligações covalentes, uma molécula hóspede (Veiga, Pecorelli *et al.*, 2006).

No entanto, para que ocorra a formação de um complexo de inclusão, é necessário que haja compatibilidade geométrica entre as moléculas hóspede e hospedeira, ou seja, a molécula hóspede tem de penetrar e ajustar-se total ou parcialmente na cavidade apolar da CD. Usualmente, as moléculas hidrófobas ou que contêm grupos hidrófobos têm maior afinidade para a cavidade central das CDs quando se encontram numa solução aquosa, uma vez que a cavidade lhes proporciona uma matriz micro-heterogénea nesse solvente polar (Veiga, Pecorelli *et al.*, 2006).

A inclusão das moléculas hóspedes na cavidade das CDs é condicionada não só pelos fatores estereoquímicos relacionados com a forma e o tamanho das moléculas hóspedes, como também pela polaridade dessas moléculas (Lezcazo *et al.*, 2002).

Geralmente, em solução aquosa, a cavidade apolar das CDs é ocupada por moléculas de água, as quais se encontram num ambiente energeticamente desfavorável, dada a natureza da interação polar-apolar. Assim a formação de complexos de inclusão ocorre

através de um processo em que as moléculas de água, localizadas na cavidade central das CDs, são substituídas por uma molécula hóspede ou por grupos lipófilos dessa molécula que apresentem polaridade, tamanho e forma compatíveis (Brewster e Loftsson, 2007). Este processo encontra-se representado na figura (II).

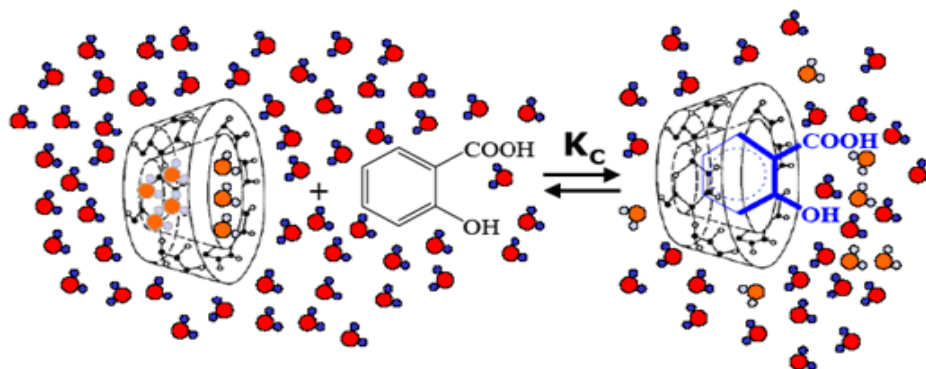


Figura II: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão, sendo o ácido salicílico a molécula hóspede, (adaptado de Uyar, *et al.*, 2005).

A força motriz do processo de complexação, também denominado por encapsulação molecular, consiste na substituição de moléculas de água de elevada entalpia, por moléculas hóspedes adequadas (Szejtli, 1998). Este processo apresenta-se extremamente favorável a nível energético e contribui também para o aumento de entropia e para a redução da energia total do sistema (Loftsson e Duchene, 2007).

Outras forças, para além do mecanismo anteriormente referido, contribuem também para a formação e estabilização dos complexos de inclusão, nomeadamente as ligações de hidrogénio (entre a molécula hóspede e os grupos hidroxilos das CDs), as interações de Van der Waals (ligações dipolo-dipolo e forças de dispersão de London), interações hidrófobas, libertação da energia de deformação do anel macromolecular das CDs e ainda, efeitos estéricos. A contribuição relativa de cada uma destas forças depende da natureza da molécula hóspede complexada, assim como da estrutura da CD envolvida no processo de complexação (Liu e Guo 2002).

É de realçar que a ligação da molécula hospedeira com a molécula hóspede não é fixa ou permanente, mas está em equilíbrio dinâmico. A força da ligação depende do quão bem o complexo “hospedeiro/hóspede” se encaixa, e quão específicas são as interações locais entre os átomos de superfície. A arquitetura das CDs confere às moléculas hóspedes, uma vasta gama de propriedades químicas marcadamente diferentes daquelas exibidas por carboidratos não-cíclicos na mesma faixa de peso molecular (Mosher e Thompsson, 2002).

Apesar de haver inúmeros trabalhos científicos e patentes até hoje publicados, relatando fenómenos de complexação com CDs, não significa que toda e qualquer molécula possa ser complexada, uma vez que existem muitas substâncias para as quais a complexação com CDs não é possível ou não apresenta quaisquer vantagens (Sá Barreto e Cunha-Filho, 2008).

A formação dos complexos fármaco-CD é altamente condicionada pela estrutura e propriedades físico-químicas dos fármacos e das CDs, pois para que um complexo de inclusão seja formado, a molécula do fármaco tem que ajustar-se total ou parcialmente no interior hidrofóbico da cavidade da CD. Os fatores que influenciam todo o processo de formação dos complexos de inclusão fármaco-CD são abaixo descritos (Veiga, Pecorelli *et al.*, 2006).

1.3.1.- Molécula hóspede e CD: Propriedades físico-químicas

O tamanho, a polaridade e a respetiva forma das moléculas de fármaco são fatores determinantes para a capacidade de acomodação destas moléculas na cavidade das CDs. De uma maneira geral, as moléculas hidrófilas de reduzido ou elevado tamanho, tais como as proteínas, os peptídeos, os polissacarídeos e, ainda, as moléculas ionizadas, não podem ser complexadas. Por outro lado, os compostos inorgânicos não são na sua maioria adequados para a complexação com as CDs, embora existam algumas exceções que incluem os ácidos não dissociados, halogéneos e outros gases, tais como o dióxido de carbono e o propano (Szejtli, 1991).

Apenas as moléculas apolares (ou grupos funcionais de moléculas), cujas dimensões sejam inferiores às da cavidade da CD, podem ser incluídos nessa cavidade (Bilensoy *et al.*, 2006).

Em suma, pode-se referir que a capacidade de acomodação das moléculas de fármaco na cavidade das CDs hospedeiras é determinada pelos seguintes fatores:

1. *Tamanho da cavidade da CD* – A α -CD apresenta uma cavidade demasiado pequena para a inclusão de moléculas com estrutura semelhante ao naftaleno, mas já a γ -CD pode acomodar moléculas com estrutura comparável ao antraceno. Assim, a α -CD pode ter aplicação na inclusão de moléculas de tamanho reduzido ou cadeias laterais de moléculas volumosas, como é o caso das prostaglandinas. Por sua vez, a β -CD é muito útil na complexação de moléculas que possuam pelo menos um anel aromático (Krzysztof e Katarzyna, 2008).
2. *Derivatização das CDs naturais* – A derivatização das CDs altera fortemente as propriedades das CDs naturais. Por exemplo, no caso de algumas CDs metiladas e do derivado sulfobutil-éter da β -CD (DM- β -CD e SBE- β -CD), as eficiências de complexação são em regra superiores às da β -CD devido ao prolongamento do espaço hidrofóbico da cavidade da CD promovida pela introdução dos substituintes (Mosher e Thompson, 2002).
3. *Substituição molar dos derivados das CDs* – As propriedades complexantes das CDs são condicionadas pelo número médio de grupos substituintes existentes por unidade de glucose. Regra geral, os derivados que apresentam menor grau de substituição molar são melhores agentes complexantes (Szente e Szejtli, 1999).

4. *Solubilidade intrínseca dos fármacos* – Quanto menor a solubilidade intrínseca de um fármaco, maior será o aumento relativo de solubilidade promovido pela complexação com as CDs. Assim, os fármacos que apresentam valores de solubilidade na ordem dos $\mu\text{g/ml}$, terão um aumento de solubilidade muito superior aos fármacos cuja solubilidade se encontra na ordem dos mg/ml (Loftsson e O'Fee, 2003).

5. *Fármacos hidrofílicos com solubilidade aquosa limitada* – Boas propriedades complexantes podem ser apresentadas por fármacos de carácter anfotérico e por fármacos polares com solubilidade aquosa limitada. A origem da reduzida solubilidade destes fármacos relaciona-se com a elevada energia dos seus cristais e não com a sua lipófilia. Uma vez em solução, as moléculas de fármaco hidratadas têm uma reduzida tendência para serem incluídas na cavidade das CDs. Contudo, estes fármacos, quando ionizados, poderão formar complexos de inclusão, sendo desta forma possível aumentar a sua solubilidade por um correto ajuste de pH associado à complexação com CDs (Loftsson e Petersen, 1999).

I.3.1.1- Complexação

Como já foi referido, uma das propriedades das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com várias substâncias. O requisito mínimo para que o processo ocorra é que a molécula hóspede seja incluída, total ou pelo menos parcialmente, na cavidade da CD. No entanto, a complexação de uma molécula hóspede relativamente à cavidade da CD é determinada, para além do tamanho relativo das duas moléculas, pela sua hidrofobicidade e geometria (Baudin *et al.*, 2000).

A extensão da complexação em meio aquoso é caracterizada pela constante estabilidade (também denominada constante de dissociação ou de formação) do complexo K_C (Mosher e Thompson, 2002).

Foi relatado por Pitha e seus colaboradores, em 1983 (Pitha e Szente, 1983), que apenas os complexos com constantes de estabilidade compreendidas entre 200 e 5000 M^{-1} poderiam ter aplicações práticas, uma vez que os complexos lábeis levam à libertação prematura do fármaco e, por outro lado, os complexos muito estáveis originam uma libertação retardada ou não tão completa do fármaco no organismo. Complexos de inclusão que apresentam constantes de estabilidade compreendidas entre 7 e 100 M^{-1} foram estudados por muitos autores. Um dos melhores exemplos que atesta o acima referenciado foi a formação de complexos de inclusão do ácido bifenilacético, do estradiol e da digitoxina com a DM- β -CD, que apresentaram constantes de estabilidade de 19.000, 55.000 e 84.000 M^{-1} respetivamente, o que demonstrou estabilidades abaixo do limite inferior bem como estabilidades acima do limite máximo, tal como havia referido Pitha (Pitha *et al.*, 1992).

O efeito das CDs na solubilidade e estabilidade do candesartan no estado líquido e sólido foi estudado por Al Omari e colaboradores. Estes verificaram que os valores de K_C foram de $5,87 \times 10^3$; $4,49 \times 10^3$; $0,94 \times 10^3$ e $0,40 \times 10^3 M^{-1}$ para β -CD, HP- β -CD, γ -CD e α -CD, respetivamente (tabela IV) (Al Omari *et al.*, 2010).

Tabela IV: Constante de Estabilidade dos complexos candesartan / CDs em tampão fosfato 0,1 M a pH 8,0 e 25 ° C, (adaptado de Al Omari *et al.*, 2010).

CD	$K_C \times 10^{-3} (M^{-1})$
β -CD	5.87
HP- β -CD	4.49
γ -CD	0.94
α -CD	0.40

Os baixos valores de K_C , apresentados pela α -CD e γ -CD são devido a dois fatores: (a) - são altamente solúveis em água havendo assim diminuição da força motriz para a complexação com a molécula de candesartan; (b) – o pequeno tamanho da cavidade de α -CD reduz a probabilidade de incluir os grupos volumosos da molécula de candesartan, enquanto que a γ -CD tem uma cavidade com elevado tamanho, diminuindo assim as interações efetivas com a molécula de candesartan (Ribeiro e Veiga, 2002; Taraszewska, Migut e Kozbiat, 2003).

Embora a HP- β -CD apresente uma elevada solubilidade aquosa, semelhante a α -CD e γ -CD, possui maior constante de estabilidade ($4,49 \times 10^3 M^{-1}$) em comparação com os valores obtidos para α -CD ($0,40 \times 10^3 M^{-1}$) e γ -CD ($0,94 \times 10^3 M^{-1}$). Tal facto indica que o tamanho da cavidade das CDs desempenha um papel importante na formação do complexo e na força de ligação deste (Al Omari *et al.*, 2010).

I.3.1.2- Estequiometria e dose terapêutica

Outro fator limitante da complexação de fármacos é a estequiometria dos complexos. Habitualmente, os complexos fármaco-CD formam-se na proporção de 1:1 ou 1:2 mas, quando uma molécula hóspede é longa, a sua inclusão poderá dar-se por mais do que

um lado, formando conseqüentemente complexos 1:3, 2:2, 2:3, etc. (Davis e Brewster, 2004).

De forma a sofrer complexação, os fármacos têm de apresentar um peso molecular que varia geralmente entre 100 a 400 Da, e as CDs têm de possuir um peso molecular muito superior (972, 1135 e 1297 para a α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente). Esta diferença de pesos moleculares, bem como a estequiometria dos complexos, limitam em grande parte a quantidade de fármaco que pode ser veiculado através do processo de complexação (Davis e Brewster, 2004).

Todas estas condicionantes obrigam a que 100 mg de complexo contenham apenas 5 a 25 mg de substância ativa. Assim, quando a dose terapêutica não é superior a 25 mg e quando o teor de substância ativa no complexo é de 5%, esta poderá ser incorporada sob a forma de comprimidos de aproximadamente 500 mg. Contudo, é de especial importância que, se o peso do comprimido for restritivo, há que considerar outras formas farmacêuticas como veículo dos complexos, como por exemplo a forma de pó em saquetas. Sendo assim, apenas os fármacos cujas doses terapêuticas sejam inferiores a 5 mg, são os ideais para a complexação com as CDs (Hirayama e Uekama, 1999).

I.3.1.3- Toxicidade

Caso a via de administração não seja a mais adequada para um determinado tipo de CD, a toxicidade destas poderá tornar-se num entrave. A via de administração oral não oferece grandes limitações, o que não se verifica com a via intravenosa, não sendo assim a mais indicada para a administração de complexos com a β -CD, uma vez que esta se acumula no rim podendo provocar graves problemas renais (Boulmedarat *et al.*, 2005).

As CDs menos problemáticas em termos de toxicidade, nomeadamente para administração parenteral, são a γ -CD, a HP- β -CD e SBE- β -CD (Loftsson e Duchene, 2007).

I.3.1.4 - Dissociação dos complexos

A semi-vida do complexo é de apenas algumas milésimas de segundo, uma vez que a cinética de formação e dissociação de complexos fármaco-CD em solução é extremamente rápida, o que significa que os complexos fármaco-CD estão continuamente a ser formados e dissociados. Para uma melhor compreensão do referido anteriormente, pode dizer-se que o fenómeno de complexação em solução é um processo dinâmico onde as espécies envolvidas não estabelecem ligações covalentes entre si. Assumindo a formação de um complexo de estequiometria de 1:1, tal como representado esquematicamente na figura III, o equilíbrio estabelecido entre as moléculas de fármaco, CDs e respetivo complexo é expresso quantitativamente por uma constante de estabilidade ou constante de dissociação (K_C) descrita na equação [1.1], onde [fármaco-CD], [fármaco] e [CD] são respetivamente as concentrações do fármaco complexado, fármaco livre e CD livre (Challa *et al.*, 2005).

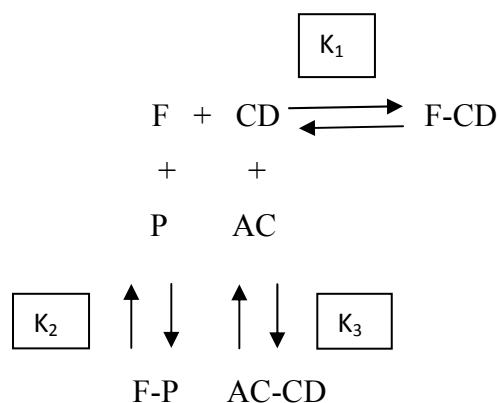
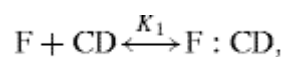


Figura III: Esquema dos equilíbrios de ligação às proteínas plasmáticas e substituição competitiva no processo de formação e dissociação de complexos F-CD, (adaptado de Stella *et al.*, 1999).

Esses equilíbrios, representam a ligação de um fármaco (F) a uma CD, ligação de um fármaco a uma proteína (P) e ligação de um agente competitivo (AC) a uma CD. As constantes de estabilidade dos equilíbrios 1,2,3 (K_1 , K_2 , K_3), são respetivamente as constantes de estabilidade do complexo fármaco-CD ou K_C , da ligação fármaco-proteína e do complexo agente competitivo-CD. A libertação rápida e completa, do fármaco a partir de complexos com fraca ou moderada estabilidade, é conseguida pela simples diluição do complexo fármaco-CD, representada pelo equilíbrio 1 (Stella *et al.*, 1999). Contudo, no caso de as ligações fármaco-CD serem fortes, com K_C iguais ou superiores a 10^4 M^{-1} , ou quando os efeitos da diluição são limitados (via de administração ocular, nasal, sublingual, dérmica ou rectal), deverá ser considerada a contribuição dos outros equilíbrios para a libertação do fármaco a partir de complexos com CDs, ou seja, ligação do fármaco às proteínas plasmáticas ou proteínas dos tecidos e substituição competitiva do fármaco incluído por compostos endógenos, tais como sais biliares existentes no tracto gastrointestinal ou lípidos da pele (Loftsson e Masson, 2001).

As constantes de estabilidade ou equilíbrio (K_C) ou as constantes de dissociação (K_d) dos complexos de fármaco-CD são importantes uma vez que demonstram as alterações nas propriedades físico-químicas de um composto em inclusão.

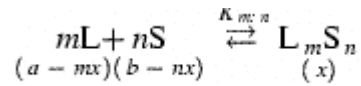
Embora seja possível utilizar ambas as moléculas (hóspede e hospedeira), para a determinação das constantes de equilíbrio, as propriedades da molécula hóspede são mais facilmente avaliadas (Astray *et al.*, 2009).



$$K_1 = \frac{[F : CD]}{[F][CD]},$$

Equação 1.1 - (adaptado de Astray *et al.*, 2009).

A constante de estabilidade (K_c) é melhor expressa como $K_{m:n}$, para indicar a estequiometria do complexo.



Equação 1.2 – (adaptado de Astray *et al.*, 2009).

De modo que,

$$K_{m:n} = \frac{[x]}{[a - mx]^m [b - nx]^n}$$

Equação 1.3 - (adaptado de Astray *et al.*, 2009).

Além disso, a constante de dissociação (K_d) pode também ser definida:

$$K_d = \frac{[a - mx]^m [b - nx]^n}{[x]} = \frac{1}{K_c} \quad \text{ou} \quad \frac{1}{K_{m:n}}$$

Equação 1.4 - (adaptado de Astray *et al.*, 2009).

É de realçar que a magnitude da constante K_C varia geralmente entre 0 e 10^5 M^{-1} , sendo obtido o valor de 0 se o fármaco for incapaz de formar um complexo de inclusão com a CD e 10^5 para o limite superior (Astray *et al.*, 2009). Quanto maior for a ligação fármaco-CD e K_C , mais lenta será a cinética de dissociação. Contudo, considera-se que a velocidade de dissociação dos complexos é praticamente instantânea, especialmente após a sua administração oral e parentérica cujo volume de diluição é elevado (Stella *et al.*, 1999).

Depois de administrado, independentemente da via de administração, o complexo fármaco-CD é sujeito a três tipos de equilíbrios diferentes, como sugerido na figura III.

Assim, a entrada do fármaco lipófilo para o interior dos tecidos biológicos, não acessíveis aos complexos e CDs, favorece a dissociação do complexo. Caso o complexo esteja localizado na proximidade de uma membrana biológica lipófila, como a membrana mucosa do trato gastrointestinal ou a superfície da pele, ele é transferido para a matriz para a qual apresenta maior afinidade (Astray *et al.*, 2009).

É de realçar que, para além dos mecanismos citados, devem ainda ser mencionados o efeito da temperatura e do pH no processo de dissociação do fármaco-CD. Sendo o processo de complexação um fenómeno exotérmico, o aumento da temperatura pode levar ao enfraquecimento da estabilidade do complexo, com incremento da fração livre da molécula hóspede. Por outro lado, o efeito do pH é um fator a considerar no caso dos fármacos ou CDs serem ionizáveis, pois a variação do pH pode induzir uma diminuição no valor de K_C (Connors, 1997; Del Valle, 2004).

I.4- Vantagens e aplicações da utilização das Ciclodextrinas

A modificação química das CDs naturais aumenta a resistência destas moléculas à hidrólise enzimática, por diminuição da afinidade das CDs para as enzimas, ou por redução da reatividade intrínseca das enzimas. Assim sendo, muitos derivados químicos das CDs são excretados nas fezes, de forma quase intacta e não metabolizada (Fromming e Szejtli, 1994).

Diversos estudos, também demonstraram que as CDs administradas por via oral praticamente não apresentam toxicidade, pois são moléculas de natureza hidrófila e de elevado tamanho tendo uma limitada ou nula absorção gastrointestinal e também uma limitada ou nula absorção aquando da sua passagem por membranas biológicas lipófilas (Stella e Rajeswski, 1997; Chen *et al.*, 2004).

As CDs aumentam então a permeabilidade do fármaco através da mucosa, principalmente através do aumento da disponibilidade do fármaco livre na superfície de absorção (Zuo *et al.*, 2000). A complexação com as CDs pode proporcionar uma melhor e uniforme absorção de fármacos pouco solúveis, reforçando assim a atividade do medicamento na administração oral (Choi *et al.*, 2001; Fathy e Sheha, 2000).

Devido à capacidade das CDs poderem formar complexos de inclusão em que a molécula hóspede é rodeada pelo ambiente hidrófobo da cavidade central da CD, tanto em solução como no estado sólido, origina modificações nas propriedades físicas e químicas da molécula incluída. Estas modificações têm consequentemente implicações ao nível das propriedades biológicas da molécula hóspede (fármaco) e são particularmente úteis no sector farmacêutico (Luppi, *et al.*, 2011; Hamoudi, *et al.*, 2011). Não obstante, as CDs são também utilizadas no sector alimentar (Nedovic *et al.*, 2011), nos cosméticos (Buschmann e Schollmeyer, 2002; Prow, *et al.*, 2011), na proteção do meio ambiente (Lezcano *et al.*, 2002), na bioconversão (Koukiekolo *et al.*, 2001; Imoto, Nishioka e Tamura, 2011) e na indústria de plásticos e têxteis (Szejtli, 2003; Ciobanu, *et al.*, 2012).

Para além das suas aplicações como excipientes farmacêuticos, existem também alguns indícios de que estas moléculas possam atuar como agentes terapêuticos, devido à capacidade de complexarem *in vivo* moléculas hóspedes exógenas ou endógenas, como o colesterol e o ácido araquidónico, possibilitando a sua utilização no tratamento de determinadas doenças como arteriosclerose, processos inflamatórios ou infeções virais (Saltão e Veiga, 2001).

Um estudo realizado por Kim e colaboradores, demonstrou que a interação entre 7-DHC (7-dihidrocolesterol) e HP- β -CD resultou na formação de um complexo de inclusão com solubilidade aquosa melhorada em comparação com 7-DHC. A formação do complexo de inclusão foi investigada e confirmada por estudos de solubilidade (espectrofotometria UV-Vis) (Kim *et al.*, 2010).

A resistência à oxidação da vitamina D3 é aumentada ao formar complexo com a β -ciclodextrina. O complexo vitamina D3/ β -CD mostra grande estabilidade frente à luz em solução ácida ou neutra. O aumento de estabilidade também foi observado na

complexação de β -CD com aspirina, nitrocepa, metronidazol, certos anti-inflamatório e antibióticos (Munoz-Botela, Del Castillo e Martin, 1995; Imoto, Nishioka e Tamura, 2011).

Ainda na área farmacêutica, as ciclodextrinas atuam como veículo, aumentando a solubilidade de certos anti-inflamatórios (Yadav, 2010).

Nos últimos anos, e com a ajuda de métodos tecnológicos e muita pesquisa, assistiu-se a reduções nos custos de produção das CDs, viabilizando assim sua aplicação farmacêutica. Além das CDs naturais, surgiram promissores derivados semi-sintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a hidroxi-propil- β -CD (HP- β -CD) e a sulfo-butil-éter- β -CD (SBE- β -CD) (Szejtli, 2005).

Segundo estatísticas, as associações com CDs já foram estudadas com 515 substâncias ativas, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (Szejtli, 2005).

Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial incorporam este excipiente nas suas fórmulas (Davis e Brewster, 2004; Loftsson e Duchene, 2007). Na tabela V pode constatar-se a relação entre algumas das apresentações comerciais disponíveis, suas aplicações e procedências.

Tabela V: Medicamentos disponíveis no mercado mundial contendo CDs, (adaptado de Cunha Filho e Sá-Barreto, 2007).

	Fármaco	Nome comercial	Indicação	Formulação	País
β-CD	Nicotina	Nicorette	Abstinência	Cp. Sublingual	Suécia
	Nimesulida	Mesulid/Nimedex	Anti-inflamatório	Comprimidos	Itália
	Omeprazol	Omebeta	Antiulceroso	Comprimidos	Alemanha
	PGE ₂	Prostarmon E	Indução de parto	Comprimidos	Japão
	Piroxicam	Cicladol	Anti-inflamatório	Cp./supositórios	Itália
	Cefalosporina	Meiaact	Antibiótico	Comprimidos	Japão
	Dexametasona	Glymesason	Analgésico	Creme dérmico	Japão
	Cetirizina	Cetirizin	Anti-histamínico	Comprimido mastigável/ cp.	Alemanha
RM-β-CD	17β-estradiol Hemihidratado	Aerodiol	Terapia hormonal	Spray nasal	França
	Cloranfenicol	Clorocil	Antibiótico	Colírio	Portugal
SBE-β-CD	Ziprasidona	Zeldox/Geodon	Antipsicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
	Voriconazol	VFEND	Antimicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
HP-β-CD	Indometacina	Indocid	Antiinflamatório	Colírio	Bélgica
	Itraconazol	Sporanox Liquid	Antifúngico	Oral	Bélgica
	Mitomicina	Mitozytrex	Antineoplásico	Solução parenteral	Suíça
α-CD	PGE ₁	Prastandim/Edex/Viridal	Vasodilatador	Solução parenteral	Japão
	Cefotiam-hexatil	Pansporin T	Antibiótico	Comprimido	Japão
HP-CD	Diclofenaco sódico	Voltaren Ophtha	Antiinflamatório/Analgésico	Colírio	Suíça
	Tc-99 Teboroxime	Cardiotec	Para Diagnóstico	Solução parenteral	EUA

Com o decorrer dos anos, tem-se assistido a um crescente interesse no desenvolvimento de preparações orais com controlo da velocidade e/ou tempo de libertação, pelo facto do processo de libertação de fármacos a partir das respetivas formulações constituir uma

etapa crítica da sua eficácia terapêutica. Por outro lado a administração oral é o método mais conveniente e frequente de libertação de fármacos (Zhang e Rees, 1999).

No intuito da obtenção de formulações farmacêuticas cada vez mais avançadas, têm sido desenvolvidos vários tipos de materiais de transporte de fármacos, com o objetivo de libertarem, de forma eficiente e rápida, a quantidade de fármaco, no seu local de ação, por um período de tempo pré-estabelecido.

As CDs naturais e os seus derivados químicos têm sido muito utilizados para otimizar várias propriedades dos fármacos como a velocidade de dissolução, solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (Chen *et al.*, 2004). Assim sendo, de entre as várias CDs quimicamente modificadas, as CDs hidrófobas podem ser utilizadas como transportadores de libertação prolongada de fármacos solúveis em água, incluindo péptidos e proteínas, enquanto que as CDs hidrófilas ou ionizáveis, aumentam a absorção de fármacos (Chen *et al.*, 2004).

As CDs possuem características multifuncionais, que fomentam o desenvolvimento racional de formulações farmacêuticas destinadas à administração oral. A combinação adequada de encapsulação molecular de CDs com outros sistemas de transporte poderá vir a ser um método muito eficaz na otimização e desenvolvimento de novos sistemas de libertação oral de fármacos (Evrard *et al.*, 2002).

Outra das vantagens das CDs é a possibilidade de poderem aumentar a estabilidade de fármacos instáveis em meio aquoso e diminuir a sua irritação no local de administração, podendo assim serem utilizadas em preparações injetáveis para uso parentérico (Proniuk *et al.*, 2002).

Contudo, para que os derivados de CDs possam ser considerados como ótimos transportadores de fármacos para a administração parentérica, devem apresentar algumas características (Szente e Szejtli, 1999):

- Atoxicidade;
- Ausência de atividade farmacológica;
- Elevada solubilidade aquosa à temperatura ambiente;
- Elevado e potente efeito solubilizante em relação a vários fármacos lipófilos;
- Capacidade de se biodegradarem na corrente sanguínea e de serem eliminados sob a forma de metabolitos de tamanho reduzido;
- Obtenção com elevado grau de pureza e com custos reduzidos.

Nos últimos anos, os sistemas de libertação transdérmica de fármacos, tanto por ação local, como sistémica, têm-se evidenciado. As CDs têm também sido utilizadas para a otimização da libertação transdérmica de fármacos (Ca e Centkowska, 2008).

Na libertação transdérmica, as CDs possuem a particularidade de aumentarem a estabilidade, libertação e biodisponibilidade de fármacos, bem como a atenuação da irritação local (Martins e Veiga, 2002).

Estudos mostraram que as CDs naturais, α , β , e γ são de grande interesse como compostos adicionais em formulações que aumentam a permeabilidade cutânea. As CDs induzem mudanças fundamentais na estrutura da formulação como foi confirmado por microscopia eletrónica de transmissão, levando ao aumento da permeabilidade da pele para a progesterona. Além disso, a incorporação das CDs aumenta também a estabilidade da formulação (Klang *et al.*, 2010).

Também pela capacidade que as CDs evidenciam ao modificar as características dos fármacos, são consideradas excipientes de grande utilidade em formulações oftálmicas (Jansook *et al.*, 2010). É contudo, importante realçar que nestes casos, apenas devem ser utilizados conservantes hidrófilos, pelo facto de ser provável a complexação de conservantes de natureza lipófila pelas CDs, com conseqüente redução da sua atividade antimicrobiana (Loftsson e Jarvinen, 1999). Estudos demonstraram que as CDs

aumentam a permeabilidade dos fármacos, ao colocá-los na superfície ocular. A formulação constituída por γ -CD aumenta a biodisponibilidade do fármaco (dorzolamida) bem como uma máxima resposta midriática, ao melhorar a sua permeabilidade ocular e reduzindo uma possível irritação, devido à manutenção do pH fisiológico (Jansook *et al.*, 2010).

Schoch *et al.*, demonstraram que a HP- β -CD, *in vitro*, aumentou significativamente a permeabilidade da córnea ao diclofenac sódico (Schoch, Bizec e Kis, 2006).

Foi também demonstrado que a molécula HP- β -CD aumentou a permeabilidade e a resposta miótica do nitrato de pilocarpina sem dano para o tecido córneo (Aktas *et al.*, 2003).

É de conhecimento geral, que um importante fator precedente da permeação do fármaco através da mucosa bucal é a sua solubilidade no meio aquoso que circunda a mesma, ou seja, a saliva. Tendo assim em consideração que grande parte dos fármacos apresenta uma estrutura hidrofóbica, e na tentativa de melhorar a solubilidade de fármacos fracamente solúveis em meio aquoso, surge a complexação com CDs associada à adição de polímeros bioadesivos na formulação de sistemas destinados à administração bucal de fármacos (Boulmedarat *et al.*, 2005).

Em suma, diversos estudos realizados levaram à conclusão que os complexos obtidos entre fármacos e CDs hidrófilas, caracterizados por uma dissolução rápida, são adequados para administração bucal e sublingual (Boulmedarat *et al.*, 2005; Jain, Aungst e Adeyeye, 2002; Jug e Becirevic-Lacan, 2004). Estas vias de administração permitem obter um rápido aumento da concentração de fármaco a nível sistémico e evitam o seu metabolismo intestinal ou hepático (Mannila *et al.*, 2005).

No que respeita à administração rectal de CDs, estas são utilizadas no desenvolvimento de sistemas de libertação, principalmente para a estabilização, modificação do comportamento farmacocinético e/ou farmacodinâmico e diminuição da irritação local de fármacos a nível rectal (Matsuda e Arima, 1999).

As CDs melhoraram assim a estabilidade do fármaco, quer inibindo a interação do fármaco / veículo ou inibindo a bioconversão do fármaco no reto. Através de um estudo, comprovou-se que a α CD melhorou a biodisponibilidade rectal de morfina inibindo o movimento ascendente do fármaco a partir de áreas afetadas por metabolismo de primeira passagem (Matsuda e Arima, 1999).

Ao nível da administração nasal, as CDs também são excipientes seguros e eficazes como promotores da absorção (Loftsson *et al.*, 2001). Contudo, a segurança da administração nasal crónica de CDs deverá ser confirmada por estudos clínicos conclusivos (Loftsson *et al.*, 2001). Merkus *et al.*, demonstraram que as CDs podem ser usadas com segurança no intuito de promoverem a biodisponibilidade nasal de fármacos, nomeadamente de peptídeos (Merkus *et al.*, 1999).

A molécula de midazolam é rapidamente absorvida a nível nasal, quando administrada num spray nasal aquoso (pH 4.3), contendo SBE- β -CD, e outros aditivos (Loftsson *et al.*, 2001).

É já comprovado cientificamente que as CDs apresentam imensos benefícios aquando da sua utilização conjunta com fármacos. A encapsulação molecular de fármacos pelas CDs apresenta-se vantajosa sob o ponto de vista tecnológico e biológico, uma vez que modifica as propriedades físicas, químicas e biofarmacêuticas dos fármacos, sendo facilmente conseguida e de forma menos dispendiosa do que a encapsulação de fármacos por outros métodos (Mosher e Thompson, 2002). Assim sendo, as CDs e seus complexos de inclusão podem ser utilizados na preparação de formas farmacêuticas sólidas, líquidas e semi-sólidas com aplicação nas vias de administração oral, parentérica, pulmonar, nasal, bucal, sublingual, rectal, ocular e dérmica (Redenti, Szente e Szejtli, 2000).

I.5 - Vantagens da aplicação dos complexos de ciclodextrinas em sistemas de veiculação de fármacos

Aumentar a eficiência terapêutica das formas farmacêuticas existentes tem sido um objetivo de grande interesse, e as aproximações para libertação controlada de fármacos constituem uma das opções mais recomendadas (Chong e Sullivan, 2007).

Os sistemas formados por matrizes de hidrogéis carregadas de medicamento consistem em uma das alternativas mais promissoras de libertação prolongada de fármacos devido às suas maleáveis características físico-químicas. A presença de CD nestes sistemas consegue alterar a difusão do fármaco através de modificações na sua solubilidade (Rodriguez-Perez *et al.*, 2006).

Variações na concentração e variedade da CD, torna possível modular a libertação matricial do fármaco de forma a adequá-lo às necessidades de cada sistema terapêutico (Siemoneit *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de nanopartículas também tem conseguido importantes melhorias na biodisponibilidade de fármacos, devido à atuação vetorizada e prolongada destes sistemas na superfície das membranas biológicas, com redução dos efeitos colaterais e das doses administradas (Duchene e Ponchel, 2002).

A utilização das CDs em nanosistemas permite ampliar as opções de fármacos aptos a esta abordagem além de serem peças-chave na elaboração de biossensores proteicos capazes de reconhecimento tecidual ou celular que permite ativar os mecanismos de libertação do fármaco somente no local de ação (Cao, Guo e Ping, 2005).

O Paclitaxel é um diterpenoide hidrofóbico natural caracterizando-se por ser um potente agente antineoplásico com atividade anti tumoral nos ovários, mama, cabeça e pulmão. Tem um único mecanismo intracelular de ação; inibe o crescimento celular através da promoção e estabilização dos microtúbulos, por interação com a tubulina e consequente

bloqueio da replicação celular na última fase mitótica. Este facto leva à perda de dinâmica dos microtúbulos necessárias para a divisão celular provocando consequentemente a morte celular (Agueros *et al.*, 2010).

É administrado a pacientes por perfusão. Uma vez que este composto é praticamente insolúvel em água, é solubilizado numa mistura de óleo de ricino polioxiethylado e etanol. No entanto, o seu uso está associado a reações de hipersensibilidade, neurotoxicidade e hiperlipidemia (Agueros *et al.*, 2010).

Assim, em 2005 uma formulação de paclitaxel ligado a nanopartículas de albumina (Abraxane®) para o tratamento intravenoso do cancro metastático da mama foi aprovada.

Neste contexto, a formulação para administração oral de paclitaxel iria oferecer vantagens sobre a administração intravenosa com consequente adesão do paciente, redução de custos administrativos e também facilitando o uso em regimes de tratamento crónico (Malingre, Beijnen e Schellens, 2001). Infelizmente, a biodisponibilidade oral do paclitaxel é extremamente baixa (Agueros *et al.*, 2010).

Recentemente, demonstrou-se que a combinação entre as nanopartículas e ciclodextrinas são eficazes no aumento da permeabilidade intestinal *ex vivo* do paclitaxel (Agueros *et al.*, 2009). Na verdade, as nanopartículas irão transportar os complexos fármaco-CD até a superfície da mucosa onde serão posteriormente libertados (Agueros *et al.*, 2010).

Em suma, este estudo corrobora o efeito sinérgico obtido pela combinação de nanopartículas e ciclodextrinas sobre a biodisponibilidade oral do paclitaxel. Neste caso, quando o paclitaxel foi encapsulado com nanopartículas em complexos com CDs, a biodisponibilidade oral relativa deste fármaco antineoplásico aumentou em mais de 80% (Agueros *et al.*, 2010).

As formulações lipossomais também são de grande interesse e têm sido extensivamente investigadas no sector farmacêutico como sistemas de transporte de fármacos seguros e eficazes. Em particular, entre as várias aplicações farmacêuticas dos lipossomas, estes

têm especial interesse na entrega de fármacos tópicos, devido à sua eficácia no encapsulamento de fármacos e conseqüentemente ao introduzi-los na pele, aumentando a sua eficácia terapêutica (Jain *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2003).

Em particular, tem sido relatado que as formulações lipossomais de vários anestésicos permitem um aumento da eficácia clínica em comparação com os fármacos livres (Cereda *et al.*, 2006; Mura *et al.*, 2007). Curiosamente, nos últimos anos, os lipossomas clássicos evoluíram para lipossomas "altamente deformáveis", dotados de maior capacidade de penetração da pele (Ceve e Blume, 2004; Trotta *et al.*, 2004).

Estas vesículas caracterizam-se por ser fosfolípidos com ativadores de extremidade, que são na maioria das vezes surfactantes de cadeia simples que destabilizam as bicamadas lipídicas lipossomais, aumentando a sua elasticidade e flexibilidade (Elsayed *et al.*, 2007). Vários estudos demonstraram que a penetração através da pele das vesículas lipossomais está diretamente relacionada com a sua deformabilidade. A elevada adaptabilidade de tais vesículas elásticas permite-lhes penetrar nas células do estrato córneo, e assim, penetrar também de forma intacta nas camadas mais profundas da pele, com um efeito comparável à de uma injeção subcutânea (El Maghraby, Barry e Williams, 2008).

No entanto, o aprisionamento de fármacos lipofílicos, pouco solúveis em vesículas lipossomais, requer o uso de solventes orgânicos e o uso destes é limitado devido à possível destabilização da bicamada lipídica (Jain *et al.*, 2007). Além disso, fármacos incorporados nas bicamadas da membrana, em vez de no núcleo aquoso das vesículas, são mais rapidamente libertados após a administração. Uma estratégia para ultrapassar estes inconvenientes, é adicionar o fármaco lipofílico, dissolvido num adequado solvente orgânico miscível em água, tal como o etanol, à fase hidrofílica das vesículas (Maestrelli *et al.*, 2009).

O aprisionamento de fármacos hidrofóbicos no núcleo aquoso dos lipossomas como complexos de inclusão solúveis com ciclodextrinas, tem sido proposto como uma alternativa interessante para evitar o uso de solventes orgânicos, obtendo-se assim o complexo fármaco-CDs em sistemas de lipossomais (McCormack e Gregoriadis, 1998).

Esta abordagem pode ser útil para aumentar a solubilidade do fármaco bem como a estabilidade (Loukas et al., 1998) e controlar melhor o destino *in vivo* de fármacos pouco solúveis, evitando a rápida libertação para a fase lipídica dos lipossomas observada após incorporação convencional (McCormack e Gregoriadis, 1998).

Além disso, a complexação com ciclodextrinas mostrou ser capaz de aumentar a solubilidade do fármaco e a penetração através da pele, melhorando assim a biodisponibilidade do fármaco por via tópica (Loftsson e Masson, 2001). A eficácia de tal abordagem combinada, que, simultaneamente, explora o poder de ciclodextrina solubilizante para os fármacos e a função transportadora lipossomal através da pele, foi recentemente demonstrado usando lipossomas deformáveis (Lira *et al.*, 2009; Gillet *et al.*, 2009).

Contudo, outras vantagens podem ser obtidas usando uma técnica de carregamento duplo, isto é, através da preparação de lipossomas carregados com o fármaco puro na fase lipofílica e do complexo fármaco- ciclodextrina na fase aquosa das vesículas, de modo a obter um início de ação rápido e um efeito prolongado (Bragagni *et al.*, 2010). Todos estes estudos demonstraram a importância de ensaios de pré-formulação destinadas à seleção do tipo de CD mais adequado e do método de preparação do complexo mais eficaz, de modo a obter o máximo possível de benefício da estratégia combinada.

Um estudo realizado em 2010, por Maestrelli e colaboradores demonstrou a importância da composição de vesículas e do método de carga de fármaco na determinação da eficácia terapêutica da formulação lipossomal desenvolvida (Maestrelli, 2010).

Quanto ao método de carregamento analisado neste estudo, observaram-se diferenças significativas quando o fármaco livre foi incorporado na fase aquosa ou lipofílica das vesículas, ou quando foi incorporado na fase aquosa como complexo (Maestrelli, 2010).

A técnica de carga dupla, que explora os efeitos favoráveis do complexo fármaco- CD em lipossomas, foi o método de preparação mais eficaz, dando origem a um aumento significativo da força e duração do efeito terapêutico do fármaco (Maestrelli, 2010).

Os resultados observados indicaram a influência essencial da função transportadora lipossomal e a complexação com a ciclodextrina sobre o desempenho da formulação, independentemente das propriedades físico-químicas do fármaco (Maestrelli *et al.*, 2009).

Capítulo II - Formação de complexos em solução

Devido ao facto de as CDs poderem formar complexos de inclusão quer no estado sólido como no estado líquido, onde a molécula hóspede se encontra envolvida pelo ambiente hidrofóbico da sua cavidade, estas moléculas adquirem uma característica única e especial. Em solução dá-se um equilíbrio entre as moléculas hóspedes complexadas e não complexadas. A formação destes complexos resulta também na modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas das moléculas hóspedes apresentando muitas vantagens para o sector farmacêutico (Pietersz e Tang, 2006).

Com o intuito de uma maior e melhor informação sobre o comportamento dos complexos em solução, é de reter que as alterações das propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes é que estão na origem da utilização de metodologias analíticas que permitem detetar estas variações consequentes da complexação (Uekama, Hirayama e Irie, 1998).

A solubilidade é sem dúvida a propriedade da molécula hóspede, que se pretende alterar por complexação com as CDs, a que mais interesse apresenta em termos de aplicações farmacêuticas. Assim, o método de solubilidade de fases, descrito em 1965 por Higuchi e Connors, é habitualmente utilizado como primeira verificação da formação de complexos de inclusão em solução. Este método baseia-se na monitorização das alterações de solubilidade das moléculas hóspedes induzidas pela adição de quantidades crescentes de agentes solubilizantes/complexantes, nomeadamente de CDs, hidroxil-ácidos e polímeros hidrossolúveis (Higuchi e Connors, 1965).

A nível experimental, adicionam-se iguais volumes de soluções de CDs de concentração crescente a uma quantidade em excesso de molécula hóspede. As suspensões resultantes são submetidas a agitação até que se atinja o equilíbrio termodinâmico, o que na prática corresponde ao tempo necessário para se alcançar o máximo de solubilidade da molécula hóspede. A capacidade de solubilização das CDs é então quantitativamente avaliada por intermédio de diagramas de solubilidade de fases, que não são mais do que representações gráficas das variações de solubilidade das moléculas hóspedes em função do aumento da concentração das CDs. Os diagramas de solubilidade de fases

estão dependentes do modelo de equilíbrio que se estabelece durante a formação dos complexos de inclusão, estando classificados em dois tipos, A e B, que apresentam por sua vez diferentes subtipos (Higuchi e Connors, 1965), tal como se encontra representado na figura IV.

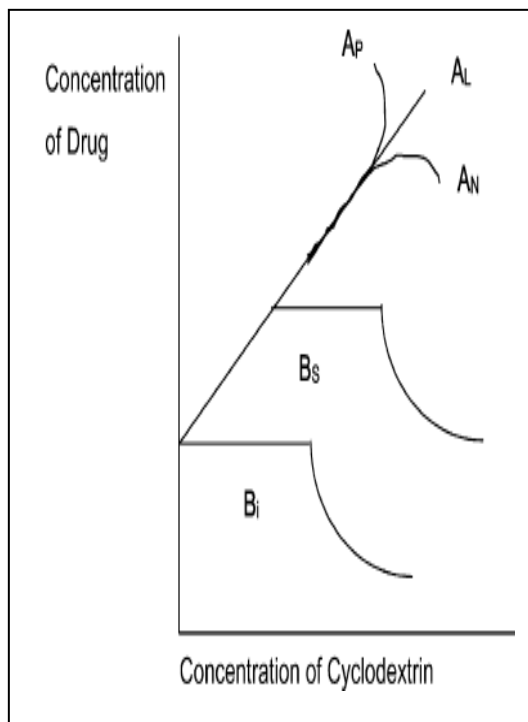


Figura IV: Diagrama tipo A e B- Relações de solubilidade de fases, (adaptado de Del Valle, 2004).

Aos diagramas de tipo A corresponde a formação de complexos solúveis e, portanto, um aumento da solubilidade da molécula hóspede em função do aumento da concentração de CD. Dependendo da natureza dos complexos formados, os diagramas poderão ser lineares, A_L , ou apresentarem uma curvatura positiva, A_P , ou negativa, A_N . Os diagramas lineares resultam da formação de complexos de primeira ordem relativamente à CD e de ordem 1 ou maior que 1 relativamente à molécula hóspede. Se o declive destes diagramas for superior a um, significa que ocorreu a formação de complexos de ordem superior a 1, apesar de não se excluir a possível presença de complexos de ordem superior, é geralmente assumida a estequiometria de 1:1 (Ribeiro, 2003).

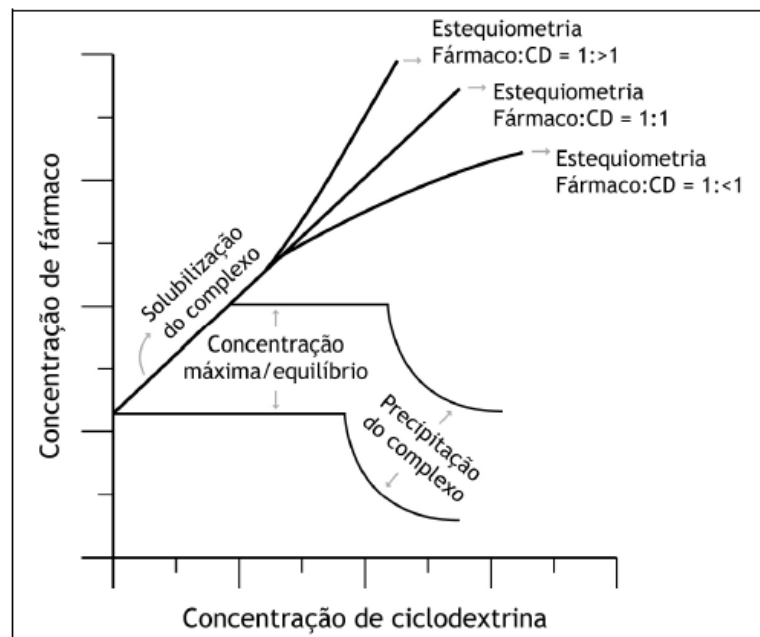


Figura V: Diagrama de fases obtido a partir da complexação de um fármaco com uma CD, (adaptado de Brewster e Loftsson, 2007).

Quando mais de uma molécula de CD intervém para a formação do complexo de inclusão, resulta um diagrama do tipo A_P , ou seja, o complexo é de ordem 2 ou superior a 2 no que respeita à CD e de ordem 1 em relação à molécula hóspede. Os diagramas do tipo A_N não são muito comuns, mas podem resultar da auto agregação dos complexos em solução ou de estarem presentes no meio de complexação, elevadas concentrações dos agentes complexantes que podem causar alterações na natureza do solvente (Loftsson, Masson e Brewster, 2004).

Tendo por base a informação resultante dos diagramas de solubilidade de fases, também se podem determinar dois parâmetros de muito interesse associados à formação dos complexos de inclusão e que caracterizam o grau de interação molecular entre os diversos componentes do complexo: estequiometria dos complexos e respetivo valor de constante de estabilidade (K_C) (Loftsson, Masson e Brewster, 2004).

O valor de K_C dos complexos formados, a estequiometria e consequente eficiência de complexação, podem ser facilmente determinados a partir do segmento ascendente

linear dos diagramas de solubilidade de fases, caso estes sejam do tipo A_L , A_P , ou B_S . É então assumida a formação de complexos de estequiometria 1:1, perante um segmento linear obtido nestes diagramas (Loftsson, Masson e Brewster, 2004).

Se a este segmento corresponder um declive equivalente a um, tem-se uma situação em que uma mole de moléculas hóspede é complexada por uma mole de moléculas de CD e portanto uma eficiência de complexação igual a 100%. Contudo, esta situação ideal raramente acontece. Na grande maioria dos casos, o declive observado para o fragmento linear dos diagramas de solubilidade de fases apresenta um valor inferior a um, e logo a resultante eficiência de complexação é inferior a 100% (Loftsson, Masson e Brewster, 2004).

Um estudo debruçou-se sobre a complexação de resveratrol com as CDs naturais (α , β e γ -CDs) e com as CDs modificadas HP- β -CD, maltosil- β -CD (G2-p-CD), metil- β -CD, carboximetil- β -e acetil- β -CD) sendo as constantes de complexação (K_C) comparadas. A K_C entre o resveratrol e cada tipo de CD foi calculada utilizando três métodos diferentes: método de solubilidade, método enzimático e fluorimétrico. Os valores de K_C obtidos mostraram que HP- β -CD apresentou valores de K_C muito altos sendo a molécula mais eficiente para a complexação com o resveratrol. A comparação dos resultados obtidos pelos três métodos revelou que o método enzimático e o método de solubilidade são os mais precisos para o cálculo de K_C entre o resveratrol e as CDs (Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

Como pode ser visto a partir da tabela VI, a CD natural β -CD apresentou os valores mais elevados de K_C no que respeita à complexação com o resveratrol ($4220 \pm 387 \text{ M}^{-1}$), enquanto que a α -CD e γ -CD apresentaram menores valores ($805 \pm 75 \text{ M}^{-1}$) e ($226 \pm 32 \text{ M}^{-1}$), respetivamente. Este resultado indicou que o tamanho da cavidade hidrofóbica de β -CD permite interações mais fortes com resveratrol, enquanto que a cavidade hidrofóbica de α e γ -CDs, é muito pequeno e muito grande, respetivamente, reduzindo assim a sua interação com resveratrol (Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

Tabela VI: Constantes de complexação (K_C) dos complexos formados entre as CDs naturais e modificadas e o resveratrol, calculada através do método enzimático, de solubilidade e fluorimétrico, (adaptado de Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

	Tipo de CD	Método Enzimático K_C (M^{-1})	Método de Solubilidade K_C (M^{-1})	Método Fluorimétrico		
				K_C (M^{-1})	K_C (M^{-1})	K_C (M^{-1})
				Regressão não-linear	Benesi-Hildebrand	Scatchard
CDs Naturais	α-CD	805 ± 75				
	β-CD	4220 ± 387	4438 ± 401	2205±364	2145±265	2383 ± 285
	γ-CD	226 ± 32				
CDs Modificadas	Hidroxipropil- β -CDs	18,048±625	18,018±723	11,035±897	11,314±889	10,229±845
	Metil- β -CDs	10,089±675				
	Maltosil- β -CDs	5098±495	5425±503	3011±435	3314±298	3224±301
	Carboximetil- β -CDs	1518±205				
	Acetil- β -CDs	1789±187				

O método físico descrito por Higuchi e Connors (1965) foi utilizado para calcular os valores de K_C para a β -CD e para duas β -CDs modificadas. O diagrama de solubilidade de fases elaborado para o resveratrol usando β -CD, HP- β -CD e G2- β -CD (figura VI) era do tipo AL, indicando a formação de complexos 1:1 tanto para as CDs naturais como para as CDs modificadas. (Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

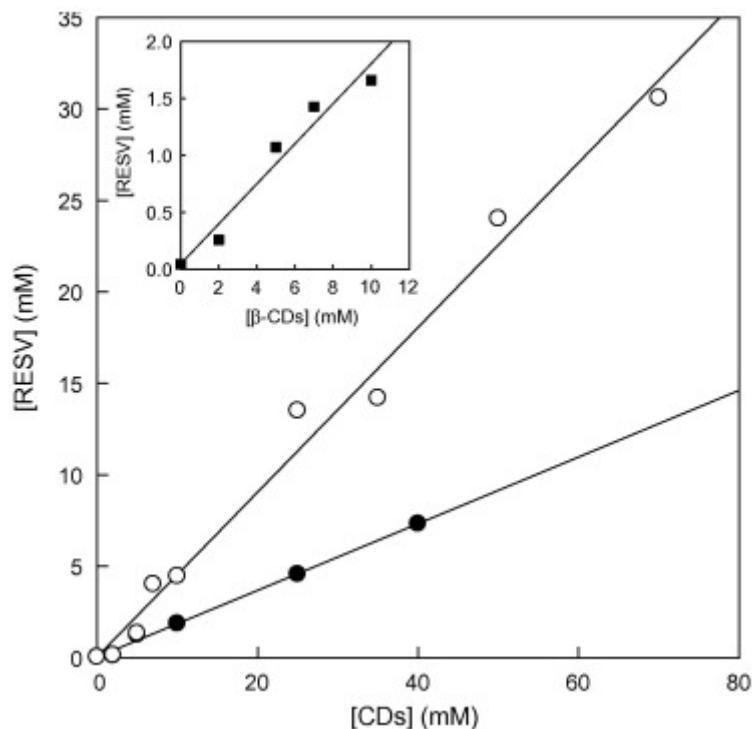


Figura VI: Diagrama de solubilidade de fases com 100mM de resveratrol e solução tampão de borato de sódio (pH 9) com HP-β-CD (□) e G₂-β-CD (•). Detalhe também para o diagrama de fases do resveratrol e β-CD (■) (adaptado de Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

Em conclusão, HP-β-CD são os agentes mais eficazes para a complexação com o resveratrol, independentemente do método de cálculo utilizado para K_C . Os métodos enzimáticos e de solubilidade são os mais precisos para calcular os valores de K_C entre o resveratrol e as CDs. Porém, no caso de compostos de resveratrol e de outros compostos que podem ser oxidados por diferentes enzimas o melhor método para calcular o valor de K_C , é o método enzimático, devido à elevada especificidade das enzimas que atuam apenas em substrato livre (Lucas-Abellán *et al.*, 2008).

Para a detecção de formação de complexos de inclusão em solução, recorre-se também aos métodos espectroscópicos (Castro *et al.*, 2001).

Muitas moléculas apresentam alterações nos seus espectros de absorção do ultravioleta/visível (UV/Vis) após a sua complexação, ocorrendo normalmente um desvio batocrômico e/ou um alargamento das bandas. Estas alterações são devidas à perturbação dos níveis de energia dos eletrões da molécula hóspede, resultante quer de

uma interação direta com a CD, quer da expulsão das moléculas de água de solvatação ou ainda da combinação destes dois efeitos (Carofiglio *et al.*, 2002).

Quando existem resultados contraditórios resultantes das técnicas acima referidas, recorre-se frequentemente ao método de espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), com o intuito de estudar de forma direta as interações entre a molécula hóspede e a CD (Fielding, 2000). Com o decorrer do tempo, a espectrometria de RMN tornou-se num método avançado e importante para a caracterização das entidades supramoleculares fármaco-CD em solução, pois permitem uma nítida distinção entre fenómenos de inclusão e possíveis interações externas observadas entre os fármacos e as CDs, sendo simultaneamente capazes de diferenciar qual a parte da estrutura química do fármaco envolvida na interação com a cavidade da CD (Schneider, Hacket e Rudiger, 1998; Delrivo, Zoppi e Longhi, 2012).

Através da realização de estudos de RMN de protão (RMN- ^1H), pode-se monitorizar as alterações dos desvios químicos dos protões à medida que a composição dos complexos é variada. Estes estudos dão a informação acerca da estequiometria dos complexos de inclusão e da dinâmica de formação. Assim sendo, a variação dos desvios químicos nos espectros RMN- ^1H é utilizada para determinar a formação de complexos de inclusão, pois quando um fármaco é incorporado na cavidade interna de uma CD, os átomos de hidrogénio localizados no seu interior (H-3 e H-5) sofrem um grande desvio químico par valores mais altos, enquanto que os átomos de hidrogénio localizados na superfície externa da CD (H-1, H-2, H-4 e H-6) não são afetados (Cobas e Martin-Pastor, 2004).

A intensidade das interações entre as moléculas de fármaco e o interior da cavidade das moléculas de CD é avaliada pela grandeza da variação dos desvios químicos observados (Fernandes, Vieira e Veiga, 2002).

Um estudo que tinha como objetivo a encapsulação de sulfodiazidas com CDs, recorreu ao método de RMN, para verificar se haveria formação de complexos. Depois de realizado, conclui-se que os protões situados no interior da cavidade hidrofóbica de M- β -CD (H^3 e H^5) exibiram desvios químicos (δ) na presença do fármaco, confirmando assim a formação de um complexo de inclusão.

O desvio químico (δ) correspondente aos prótons localizados na superfície exterior de M- β -CD (H^1 , H^2 e H^4), foi também modificado, o que pode ter sido devido a um rearranjo conformacional na molécula de acolhimento (Delrivo, Zoppi e Longhi, 2012).

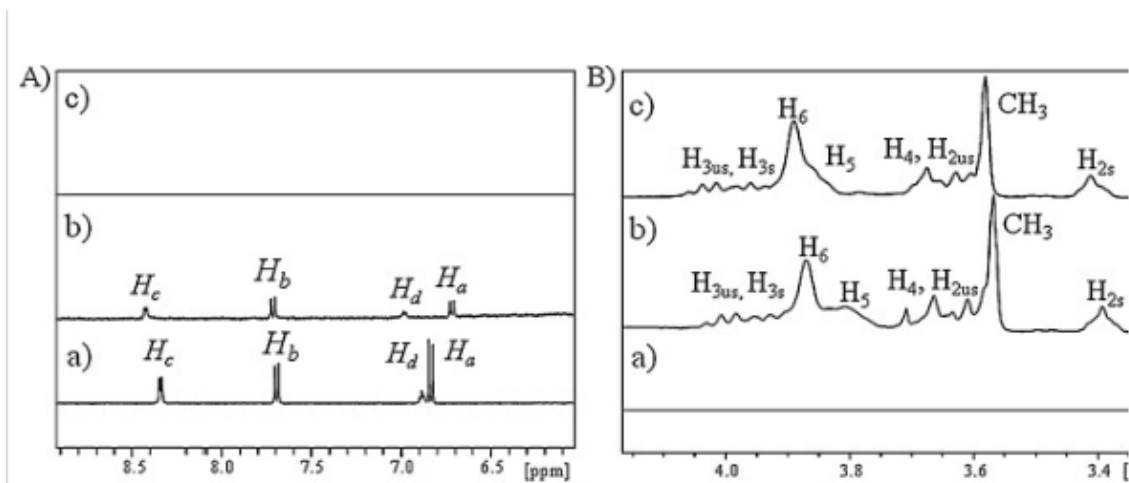


Figura VII: Gráficos (A e B): Espectros RMN- ¹H. **a)** Espectro da sulfodiazida; **b)** Espectro do complexo sulfodiazida e M- β -CD; **c)** Espectro de M- β -CD, (adaptado de Delrivo, Zoppi e Longhi, 2012).

Como instrumento para as várias aplicações da química farmacêutica, nomeadamente no desenho de fármacos e em diversos estudos, a química computacional de simulação molecular ao nível atómico (modelação molecular), mostra-se também uma importante ferramenta. Esta, permite racionalizar e complementar a observação experimental com a parte molecular. Contudo, devido ao tamanho e flexibilidade das moléculas de CDs e da multiplicidade de interações em meio aquoso, a aplicação desta química computacional no estudo dos fenómenos de inclusão Fármaco-CD é limitada. Porém, consegue-se uma boa correlação com os dados experimentais, possibilitando a representação da conformação tridimensional mais estável do complexo de inclusão (Pose-Vilarnovo *et al.*, 2001; Cirri *et al.*, 2005).

Como exemplo, mostra-se na Figura VIII o modelo teórico de maior estabilidade do complexo de piroxicam com a CD.

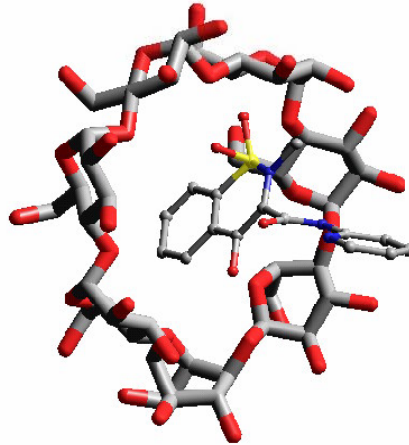


Figura VIII: Modelação molecular do complexo piroxicam-CD, (adaptado de Pose-Vilarnovo *et al.*, 2001; Cirri *et al.*, 2005).

Sendo assim, a formação de complexos em solução pode ser confirmada através das diferentes técnicas, RMN, diagramas de solubilidade de fases, espectrofotometria UV/Vis, modelação molecular, fluorescência, método enzimático, obtendo-se ainda informação acerca da estequiometria, constante de equilíbrio e geometria do complexo.

A obtenção de complexos no estado sólido poderá ser útil para a formulação de determinadas formas farmacêuticas, como por exemplo comprimidos, mas a sua concretização implica a utilização de outros processos, tais como malaxagem, co-evaporação ou liofilização. A confirmação de complexos no estado sólido implica também outras técnicas analíticas, tais como, pulverização, difração raio-X de pós, microscopia de varredura eletrónica, calorimetria diferencial de varredura e análise de termogravimetria.

Conclusão

As ciclodextrinas apresentam a propriedade de formar complexos de inclusão com muitas moléculas hóspedes, complexando uma molécula inteira, ou parte dela, tornando assim as ciclodextrinas num importante veículo para as técnicas de encapsulação.

Este tipo molecular de encapsulação, afetará muitas das propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes.

A capacidade que as ciclodextrinas possuem em formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos orgânicos, ajuda a alterar a solubilidade aparente da molécula, contribuindo para um aumento da estabilidade do composto na presença de luz, calor, de condições oxidantes, diminuindo em certos casos a volatilidade do composto. Aumentam a biodisponibilidade, mascaram sabores e odores e evitam possíveis irritações.

A versatilidade das ciclodextrinas e das ciclodextrinas modificadas, resultam na crescente importância destas, no sector alimentar, sector farmacêutico, agricultura, indústria têxtil, entre outros.

Recentes avanços biotecnológicos contribuem significativamente para melhorias no fabrico de ciclodextrinas, com baixo custo e elevado grau de pureza. Devido à sua arquitetura única, e às suas propriedades quelantes, as ciclodextrinas estão a tornar-se um fator determinante na área biotecnológica, essencialmente no encapsulamento e libertação controlada de fármacos.

Apesar da extensa e antiga aplicação das CDs em diferentes campos, o seu desenvolvimento farmacêutico é relativamente recente e a julgar pela velocidade de evolução e todo o esforço que tem sido empreendido, as dificuldades existentes atualmente não devem representar um obstáculo intransponível para a poderosa

indústria farmacêutica e é provável que o número de formulações contendo este adjuvante se amplie consideravelmente nos próximos anos.

Atualmente, investigadores estudam a utilização das CDs em diversas áreas, principalmente no sector alimentar, biotecnológico, farmacêutico e dermocosmética, nomeadamente na encapsulação de novos fármacos, no mascarar de sabores e odores, na incorporação da vitamina A em alimentos, no melhoramento de formulações (texturas de cremes, penetração cutânea, coloração) e no tratamento de patologias, nomeadamente no tratamento da malária, glaucoma, inflamação da mucosa intestinal, no desenvolvimento de prótese vasculares e mais recentemente no desenvolvimento de estratégias para a administração de fármacos não invasivos.

Espera-se que num futuro próximo as CDs possam ser utilizadas sem qualquer entrave à sua utilização nomeadamente a nível biotecnológico, farmacêutico e industrial.

Bibliografia

Agueros, M., Ruiz-Gaton, L., Vauthier, C., Espuelas, S., Ponchel, G., Irache, J. M. (2009). Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 38 (4), pp. 405-413.

Agueros, M., Zabaleta, V., Espuelas, S., Campanero, M.A., Irache, J.M. (2010). Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles, *J. Contr. Release*, 145 (1), pp. 2-8.

Aktas, Y., Unlu, N., Orhan, M., Irkeç, M., Hincal, A.A. (2003). Influence of hydroxypropyl β -cyclodextrin on the corneal permeation of pilocarpine, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29, pp. 223-230.

Al Omari, A.A., Mahmoud M.A.O., Badwan, A.A., Khaldoun, A.A. (2010). Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of candesartan cilexetil in solution and solid state, *J.Pharm.Biom.Anal.*, 54 (3), pp. 503-509.

Armbruster, F. (1988). *Use of cyclodextrins in the production of pure α and β CDs*, Int. symp. cyclodextrins, Munique (4), pp. 33-30.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydro.*, 33 (7), pp. 1631-1640.

Baudin, C., Pean, C., Perly, B., Gosselin, P. (2000). Inclusion of organic pollutants in cyclodextrin and derivatives, *Int. J. Env. Anal. Chem.*, 77, pp. 233-42.

Bekers, O., Uijtendaal, E.V., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, W.J.M. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical field, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 17, pp. 1503-1549.

Bhardwaj, R., Dorr, R.T., Blanchard, J. (2000). Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclo-dextrins, *J. Pharm. Sci. Technol.*, 54, pp. 233-9.

Bilensoy, E., Rouf, M.A., Vural, I., Sem, M., Hincal, A.A. (2006). Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: b-cyclodextrin complex, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 7 (2), pp. 54-60.

Boulmedarat, L., Bochot, A., Lesieur, S., Fattal, E. (2005). Evaluation of buccal methyl-b-cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model, *J. Pharm. Sci.*, 94, pp. 1300-1309.

Bragagni, M., Maestrelli, F., Mennini, N., Ghelardini, C., Mura, P. (2010). Liposomal formulations of prilocaine: effect of complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin on drug anaesthetic efficacy, *J. Liposome Res.*, 10 (4), pp. 1-8.

Brewster, M.E., Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59 (7), pp. 645-666.

Buschmann, H.J., Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review, *J. Cosmetic Sci.*, 53, pp. 185-91.

Ca, K., Centkowska, K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68 (3), pp. 467- 478.

Cao, F., Guo, J., Ping, Q. (2005). The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31 (8), pp. 747-56.

Carofiglio, T., Fornasier, R., Jicsinszky, L., Saielli, G., Tonellato, U., Vetta, R. (2002). Capillary electrophoresis, Roesy MNR and molecular modelling study of the inclusion complex β -cyclodextrin/lipoic acid, *Eur. J. Org. Chem.*, 7, pp. 1191-1196.

Castro, H.J.A., Ares-Mazás, M.E., Reyes, L.N., Espinar, F.O., Méndez, J.B. (2001). Inhibition of cryptosporidium infection in mice treated with a cyclodextrin in inclusion complex with diloxanide furoate, *Parasitol. Rev.*, 87 (6), pp. 449-52.

Cereda, C.M.C., Brunetto, B.G., Araújo, R.D. Paula, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration, *Can. J. Anesth.*, 53, pp. 1092-1097.

Ceve, G., Blume, G. (2004). Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage, *Biochim. Biophys. Acta*, 1663, pp. 61-73.

Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K. (2005). Cyclodextrins in Drug Delivery: An Update Review, *AAPS Pharm.Sci. Tech.*, 6 (2), pp. 329-357.

Chen, M. L., Shah, V., Patnaik, R., Adams, W., Hussain, A., Conner, D., Mehta, M., Malinowski, H., Lazor, J., Huang, S.M. (2004). Bioavailability and Bioequivalence: An FDA Regulatory Overview, *Pharm.Res.*, 18, pp. 1645-1650.

Choi, H.G., Lee, B.J., Han, J.H., Lee, M.K., Mi Park, K., Yong, C.S., Rhee, J.D., Kim, Y.B., Kim, C.K. (2001). Terfenadine-beta-Cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27, pp. 857-862.

Chong, C.R., Sullivan, D.J. Jr. (2007). New uses for old drugs, *Nature*, 448 (7154), pp. 645-646.

Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G. (2012). Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil, *Carb. Pol.*, 87(3), pp. 1963- 1070.

Cirri, M., Rangoni, C., Maestrelli, F., Corti, G., Mura, P. (2005). Development of fast-dissolving tablets of flurbiprofen-cyclodextrin complex, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31 (7), pp. 697-77.

Cobas, J.C., Martin-Pastor, M. (2004). A homodecoupled diffusion experiment for the analysis of complex mixtures by NMR, *J. Magn. Reson.*, 171 (1), pp. 20-4.

Connors, K.A. (1997). The stability of cyclodextrins complexes in solution, *Chem. Rev.*, 97, pp. 1325-57.

Cunha-Filho, M.S.S., Sá-Barreto, L.C.L. (2007). Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 28 (19), pp. 1808-4532.

Dass, C.R., Jessup, W. (2000). Apolipoproteins A-I, Cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, pp. 731-61.

Davis, M.E., Brewster, M.E. (2004). Cyclodextrins based pharmaceuticals: past, present and future, *Nature Rev. Drug Discov.*, 3 (12), pp. 1023-1035.

Delrivo, A., Zoppi, A., Longhi, M.,R. (2012). Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state, *Carb. Poly.*, 87 (3), pp. 1980-1988.

Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review, *Process. Biochem.*, 39, pp. 1033-1046.

Dorrego, B., García-Río, L., Hervés, P., Leis, J.R., Mejuto, J.C., Pérez-Juste, J. (2001). Changes in the fraction of uncomplexed cyclodextrin in equilibrium with the micellar system as a result of balance between micellization and cyclodextrin-surfactant complexation. Cationic alkylammonium surfactants, *J. Phys. Chem. B.*, 105, pp. 4912-4920.

Duan, M.S., Zhao, N., Össurardóttir, I.B., Thorsteinsson, T., Loftsson, T. (2005). Cyclodextrins solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes, *Int. J. Pharm.*, 297, pp. 213-222.

Duchene, D., Ponchel, G. (2002). Combined Poly (alkyl cyanoacrylate)/Cyclodextrin Nanoparticles, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 44, pp. 15-6.

Eastburn, S.D., Tao, B.Y. (1994). Applications of modified cyclodextrins, *Biotech. Adv.*, 12, pp. 325- 39.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 34, pp. 203-222.

Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, M.N. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, 332, pp. 1-16.

Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Van Hees, T., Crommen, J., Losson, B., Delattre, L. (2002). Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *J. Control. Release*, 85, pp. 45-50.

Fathy, M., Sheha, M. (2000). *In vitro* and *in vivo* evaluation of amylobarbitone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex prepared by freeze-drying method, *Pharmazie*, 202, pp. 165-171.

Fernandes, M.C., Vieira, M.T., Veiga, F.J.B. (2002). Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrin inclusion compounds, *Eur.J.Pharm.Sci.*, 15, pp.79-88.

Fielding, L. (2000). Determination of Association Constant (K_a) from Solution NMR Data, *Tetrahedron*, 56, pp. 6151-70.

Fromming, K., Szejtli, J. (1994). “*Cyclodextrin in Pharmacy*” Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 219.

Garcia-Rio, L., Mejuto, J.C., Nieto, M., Pérez-Juste, J., Pérez-Lorenzo, M., Rodríguez-Dafonte, P. (2005). Denitrosations of N-nitrososulfonamide as chemical probe for determination of binding constants to cyclodextrins, *Supra. Chem.*, 17, pp. 649-653.

Gillet, A., Grammenos, A., Compère, P., Evrard, B., Piel, G. (2009). Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome, *Int. J. Pharm.*, 380, pp. 174-180.

Giordano, F., Novak, C., Moyano, J.R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds, *Thermo. Acta*, 380, 125-151.

Hamoudi, M., Fattal, E., Nicolas, V., Bochot, A. (2011). Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs. In vitro studies in simulated gastrointestinal fluids, *Int. J. of Pharm.*, 416 (2), pp. 507-514.

Higuchi, T., Connors, K. (1965). Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, pp. 117-212.

Hiramaya, F., Uekama, K. (1999). Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Adv. Drug Del. Rev.*, 36, pp. 125-141.

Hirose, T., Yamamoto, Y. (2001). Hinokitol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties, *Jap. Patent JP*, 55480.

Imoto, N., Nishioka, T., Tamura, T. (2011). Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ by *Rhodococcus erythropolis*, *Bioch. Bioph. Res. Communications*, 405 (3), pp.393- 398.

Jain, A. C., Aungst, J.B., Adeyeye, M.C. (2002). Development and In vivo evaluation of buccal tablets prepared using Danazol- Sulfobutyllether- β - Cyclodextrin complexes, *J. Pharm. Sci.*, 91, pp. 1659- 1668.

Jain, S.K., Gupta, Y., Jain, A., Bholá, M. (2007). Multivesicular Liposomes Bearing Celecoxib- β -Cyclodextrin Complex for Transdermal Delivery, *Drug Del.*, 14 (6), pp. 327-335.

Jansook, P., Stefánsson, E., Thorsteinsdóttir, M., Sigurdsson, B.B., Kristjánsdóttir, S.S., Bas, J.F., Sigurdsson, H.H., Loftsson, T. (2010). Cyclodextrin solubilization of carbonic anhydrase inhibitor drugs: Formulation of dorzolamide eye drop microparticle suspension, *Eur. J. of Pharm. Biopharm.*, 76 (2), pp. 208-214.

Jug, M., Becirevic-Lacan, M. (2004). Influence of hydroxypropyl – β – cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccoadhesive tablets, *Eur. J. Pharm. Sci.*, (21), pp. 251- 260.

Kim, S.H., Youn, J.Y., Kim, K.M., Kang, K.C., Pyo, H.B., Lee, S.J. (2010). Characterization of an inclusion complex of, 7-dehydrocholesterol and cyclodextrin, *J. of Ind. and Engineering Chem.*, 16 (1), pp. 119-121.

Klang, V., Matsko, N., Zimmermann, A.M., Vojnikovic, E., Valenta, C. (2010). Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions, *Int. J. Pharm.*, 393 (1-2), pp. 153-161.

Koukielekolo, R., Desseaux, V., Moreau, Y., Marchis-Mouren, G., Santimone, M. (2001). Mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins, *Eur. J. Bioch.*, 268, pp. 841-8.

Krzysztof, C., Katarzyna, C. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects, *Eur. J. of Pharm. Biopharm.*, 68, pp. 467- 478.

Lezcano, M., Al-Soufi, W., Novo, M., Rodríguez-Núñez, E., Tato, J.V. (2002). Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha and beta-cyclodextrins, *J. Agric. Food Chem.*, 50, pp. 108- 12.

Lira, M.C.B., Ferraz, M.S., Silva, D.G.V.C., Cortes, M.E., Teixeira, K.I., Caetano, N.P., Sinisterra, R.D., Ponchel, G., Santos-Magalhães, N.S. (2009). Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposome, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 64, pp. 215-224.

Liu, L., Guo, Q.X. (2002). The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 42, pp. 1-14.

Loftsson, T., Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice, *Int. J. Pharm.*, 225, pp. 15-30.

Loftsson, T., Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.*, 329 (1-2), pp. 1-11.

Loftson, T., Brewster, M.E., (1997). Cyclodextrins as pharmaceutical excipients, *Pharm. Technol. Eur.*, 5, pp. 26-34.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, 85, pp. 1017-1025.

Loftsson, T., Masson, M., Sigurjondottir, J.F. (1999). Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins, *STP Pharm. Sci.*, 9 (3), pp. 237-244.

Loftsson, T., Matthíasson, K., Másson, M. (2003). The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs, *Int.J. Pharm.*, 262 (1-2), pp. 101-107.

Loftsson, T., O'Fee, R. (2003). Cyclodextrins in solid dosage forms, *Business Briefing: Pharmatech, Drug, Del.Oral*, pp.176-179.

Loftsson, T., Petersen, D.S. (1999). Cyclodextrin solubilization of EHT-615, a zwitterionic dru, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24, pp. 365-370.

Loftsson, T., Jarvinen, T. (1999). Cyclodextrins in ophtalmic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, pp. 59-79.

Loftsson, T., Gudmundsdottir, H., Sigurjónsdóttir, J.F., Sigurðsson, H.H., Sigfússon, S.D., Másson, M., Stefánsson, E. (2001). Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray, *Int. J. Pharm.*, 212 (1), pp. 29-40.

Loftsson, T., Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.*, 329 (1-2), pp. 1-11.

Loftsson, T., Masson, M., Brewster, M.E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *J. Pharm. Sci.*, 93 (5), pp. 1091-9.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, 85 (10), pp. 1017-25.

Loftsson, T., Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice, *Int. J. Pharm.*, 225, pp. 15-30.

Lu, X., Chen, Y. (2002). Chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection using mixed selectors of beta-cyclodextrin and sodium taurocholate, *J. Chrom. A.*, 955, pp. 133- 40.

Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E. (2008). Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays, *Food Chem.*, 111 (1), pp. 262-267.

Luppi, B., Bigucci, F., Corace, G., Delucca, A., Cerchiara, T., Sorrenti, M., Catenacci, L., Di Pietra, A.M., Zecchi, V. (2011). Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 44 (4), pp. 559-565.

Maestrelli, M.L., Capasso, G., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Ghelardini, C., Mura, P. (2009). Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes, *J. Liposome Rev.*, 19 (4) pp. 1-18.

Maestrelli, F. (2010). New “drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes” formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics, *Int. J. Pharm.*, 395 (1-2), pp. 222-231.

Malingre, M.M, Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2001). Oral delivery of taxanes, *Invest. New Drugs*, 19 (2), pp. 155-162.

Mannila, J., Järvinen, T., Järvinen, K., Tarvainen, M., Jarho, P. (2005). Effects of RM- β -CD on sublingual bioavailability of Δ^9 - tetrahydrocannabinol on rabbit, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26, pp. 71-77.

Martins, M.R.F., Veiga, F. (2002). Promotores de permeação para a libertação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 38, pp. 33-54.

Matioli, G., Zanin, J., Moraes, F. (2002). Influence of substrate and Product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, *Applied Bioch. Biotechnol.*, 98-100 (1-9), pp. 948-951.

Matsuda, H., Arima, H. (1999). Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, pp. 81-99.

McCormack, B., Gregoriadis, G. (1998). Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo, *Int. J. Pharm.*, 162, pp. 59-69.

Merkus, F.W.H.M., Verhoef, J.C., Marttin, E., Romeijn, S.G., Van der Kuy, P.H.M., Hermens, W.A.J.J., Schipper, N.G.M. (1999). Cyclodextrins in nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, pp. 41-57.

Mosher, G., Thompson, D.O. (2002). *Complexation and cyclodextrins*, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Swarbrick J.; Boylan J. C. 3^a ed). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 531-558.

Munoz-Botela, S., Del Castillo, B., Martin, M.A. (1995). Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación del complejo de inclusión, *Arsh. Pharm.*, 36 (2), pp.187-198.

Mura, P.M.T., Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Michelacci, I., Ghelardini, C., Rabasco, A.M. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, pp. 86-95.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Sci.*, 1, pp.1806-1815.

Pietersz, G.A., Tang, C., Apostolopoulos, V. (2006). Structure and Design of Polycationic Carriers For Gene Delivery, *Med. Chem.*, 6, pp. 1285-98.

Pitha, J., Hoshino, T., Torres-Labandeira, J., Irie, T. (1992). Preparation of drug-hydroxypropyl cyclodextrin complexes by a method using ethanol or aqueous ammonium hydroxide as cosolubilizers, *Int. J. Pharm.*, 80 (2-3), pp. 253-8.

Pitha, J., Szente, L. (1983). *Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners*, Controlled Drug Dev., Roca Raton (Florida): CRC Press, 1, pp. 125-148.

Pose-Vilarnovo, B., Perdomo-Lopez, I., Echezarreta-López, M., Schroth-Pardo, P., Estrada, E., Torres-Labandeira, J.J. (2001). Improvement of water solubility of sulfamethizole through its complexation with b- and hydroxypropyl-b-cyclodextrin. Characterization of the interaction in solution and in solid state, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13 (3), pp, 325-31.

Proniuk, S.B.M., Liederer, B.M., Dixon, S.E., Rein, J.A., Kallen, M.A., Blanchard, J. (2002). Topical formulation studies with DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) and cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.*, 91, pp.101-110.

Prow, T.W., Grice, J.E., Lin, L.L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurm, E.M.T., Yoong, C., Robertson, T.A., Soyer, H.P., Roberts, M.S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv. Drug Dev. Rev.*, 63 (6), pp. 470-491.

Redenti, L.E., Szente, L., Szejtli, J. (2000). Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.*, 89 (1), pp. 1-8.

Redenti, L.E., Pietra, C., Gerloczy, A., Szente, L. (2001). Cyclodextrins in oligonucleotide delivery, *Adv. Drug Delv. Rev.*, 53 (2), pp. 235- 44.

Ribeiro, L. (2003). Investigation and Physicochemical Characterization of Vinpocetine-Sulfobutyl ether b-cyclodextrin binary and ternary complexes, *Chem. Pharm. Bulletin*, 51 (8), pp. 914-922.

Ribeiro, L., Veiga, F. (2002). Complexation of vinpocetine with cyclodextrins in the presence or absence of polymers, binary and ternary complexes preparation and characterization, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 44 pp. 251-256.

Rodriguez-Perez, A.I., Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Torres-Labandeira, J.J. (2006). Drug Solubilization and Delivery from Cyclodextrin-Pluronic Aggregates, *J. Nanosci. Nanotech.*, 6, pp. 3179-86.

Sá Barreto, L.C.L., Cunha-Filho, M.S.S. (2008). Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional, *Lat. Am. J. Pharm.*, 27 (4), pp. 629-36.

Saltão, R., Veiga, F. (2001). Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos, *Brazilian J. Pharm. Sci.*, 37, pp. 1-14.

Schneider, H.J., Hacket, F., Rudiger, V. (1998). NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Chem.Rev.*, 98 (5), pp. 1755-17.

Schneiderman, E., Stalcup, A.M. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science, *J. Chrom. B.*, 745, pp.83-102.

Schoch, C., Bizec, G.C., Kis, G. (2006). Cyclodextrin derivatives and cyclofructan as ocular permeation enhancers: results with different model compounds, *J. Incl. Phenom. Macrocycl.*, 57, pp. 391-394.

Siemoneit, U., Schmitt, C., Alvarez-Lorenzo, C., Luzardo, A., Otero-Espinar, F., Concheiro, A., Blanco-Méndez, J. (2006). Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability, *Int. J. Pharm.*, 312, pp. 66-74.

Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotech. Adv.*, 20, pp. 341-59.

Stella, V.J., Rajeswski, R.A. (1997). Cyclodextrins; their future in drug formulation and delivery, *Pharm. Rev.*, 14, pp. 556-567.

Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, A.E., Zia, V. (1999). Mechanism of drug release from cyclodextrin complexes, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, pp. 3-16.

Szente, L., Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, pp. 17-28.

Szejtli, J. (2005). Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow, *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.*, 52 (1-2), pp.1-11.

Szetjli, J. (1991). Cyclodextrins in drug formulations: Part I, *Pharm. Tech. Int.*,3, pp.15-22.

Szetjli J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem. Rev.*, 98, pp. 1743-53.

Szetjli, J. (2003). *Cyclodextrins in the Textile Industry*, *Starch*, 55 (5), pp. 191.

Taraszevska, J., Migut, K., Kozbiat, M. (2003). Complexation of flutamide by native and modified cyclodextrins, *J. Phys. Org. Chem.*, 16, pp. 121-126.

Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E., Gallarate, M. (2004). Deformable liposomes for dermal administration of metotrexate, *Int. J. Pharm.*, 270, pp. 119-125.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T. (1998). Cyclodextrins in drug carrier system, *Chem. Rev.*, 98, pp. 2045-2076.

Uyar, T., Rusa, C.C., Hunt, M.A., Aslan, E., Hacaloglu, J., Tonelli, A.E. (2005). Reorganization and improvement of bulk polymers by processing with their cyclodextrin inclusion compounds, *Polymer*, 46 (13), pp. 4762- 4775.

Veiga, F., Pecorelli, C., *et al.*, (2006). *As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*, Coimbra, MinervaCoimbra.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A. (2003). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55, pp. 271-277.

Yadav, V.R. (2010). Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake, *Bioch. Pharm.*, 80 (7), pp. 1021- 1032.

Zhang, M., Rees, D.C. (1999). A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 9, pp. 1697-1717.

Zia, V., Rajewski, V., Stella, J. (2001). Effect of cyclodextrins charge on complexation of neutral and charged substrates: Comparison of sulfobutyllether- β -cyclodextrin to hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Pharm. Results*, 18, pp. 668-673.

Zuo, Z., Kwon, G., Stevenson, B., Diakur, J., Wiebe, L. (2000). Flutamide-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: formulation, physical characterization, and absorption studies using the Caco-2 in vitro model, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, pp. 220-227.